

PCT/JP2004/013987

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

16.09.2004

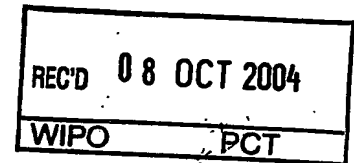
別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2003年 9月17日

出 願 番 号
Application Number: 特願2003-324153
[ST. 10/C]: [JP2003-324153]

出 願 人
Applicant(s): 住友化学工業株式会社

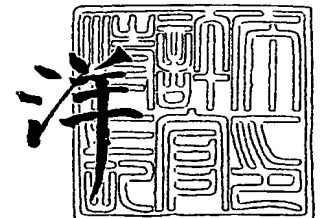


PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年 9月 2日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川



出証番号 出証特2004-3078934

【書類名】 特許願
【整理番号】 P156229
【提出日】 平成15年 9月17日
【あて先】 特許庁長官殿
【国際特許分類】 C07D311/08
A61K 31/37

【発明者】
【住所又は居所】 大阪市此花区春日出中三丁目 1 番 9 8 号 住友化学工業株式会社
内
【氏名】 東 清史

【発明者】
【住所又は居所】 大阪市此花区春日出中三丁目 1 番 9 8 号 住友化学工業株式会社
内
【氏名】 富ヶ原 祥隆

【発明者】
【住所又は居所】 大阪市此花区春日出中三丁目 1 番 9 8 号 住化テクノサービス株
式会社内
【氏名】 高橋 淳也

【特許出願人】
【識別番号】 000002093
【氏名又は名称】 住友化学工業株式会社

【代理人】
【識別番号】 100093285
【弁理士】
【氏名又は名称】 久保山 隆
【電話番号】 06-6220-3405

【選任した代理人】
【識別番号】 100113000
【弁理士】
【氏名又は名称】 中山 亨
【電話番号】 06-6220-3405

【選任した代理人】
【識別番号】 100119471
【弁理士】
【氏名又は名称】 榎本 雅之
【電話番号】 06-6220-3405

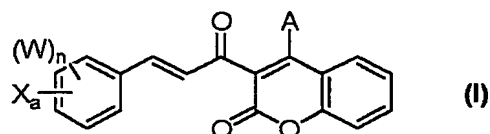
【手数料の表示】
【予納台帳番号】 010238
【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】
【物件名】 特許請求の範囲 1
【物件名】 明細書 1
【物件名】 要約書 1
【包括委任状番号】 0212949

【書類名】 特許請求の範囲

【請求項 1】

式 (I)

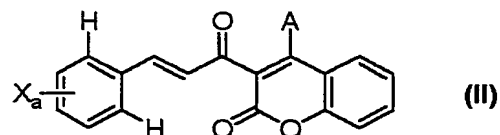


[式中、 X_a はシアノ基で置換されたC2-C4アルケニル基、 $A_1 - R_1 - O$ -基 (A_1 は、C1-C4アルキルチオ基、C2-C4アルケニル基、C2-C4アルキニル基、C1-C4アルコキシカルボニル基、カルボキシ基又はシアノ基を表し、 R_1 はC1-C4アルキレン基を表す。)、 $A_2 - (Y)_m - Z - NH$ -基 (A_2 はC2-C4アルケニル基、又は、C1-C4アルコキシ基、C1-C4アルコキシカルボニル基、カルボキシ基若しくはシアノ基で置換されたC1-C4アルキル基を表し、 Y は酸素原子又はNH基を表し、 Z はカルボニル基又はスルホニル基を表し、 m は0又は1を表す。) 又は $A_3 - NHCO$ -基 (A_3 はメタンスルホニル基、又は、水酸基、C1-C4アルコキシ基、C1-C4アルコキシカルボニル基、カルボキシ基若しくはシアノ基で置換されたC1-C4アルキル基を表す。)) を表し、 W はハロゲン原子、ニトロ基、C1-C4アルキル基又はC1-C4アルコキシ基を表し、 n は0、1又は2を表し、 n が2の場合には W は相異なってよく、 A は水酸基、C1-C4アルコキシ基、C2-C4アルケニルオキシ基、C2-C4アルキニルオキシ基、C1-C4アルキルアミノ基、C2-C4アルケニルアミノ基、C2-C4アルキニルアミノ基、モルホリノ基又はピペリジノ基を表す。]

で示される2H-1-ベンゾピラン-2-オン化合物。

【請求項 2】

式 (II)

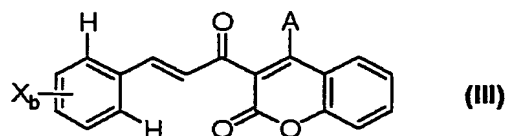


[式中、 X_a はシアノ基で置換されたC2-C4アルケニル基、 $A_1 - R_1 - O$ -基 (A_1 は、C1-C4アルキルチオ基、C2-C4アルケニル基、C2-C4アルキニル基、C1-C4アルコキシカルボニル基、カルボキシ基又はシアノ基を表し、 R_1 はC1-C4アルキレン基を表す。)、 $A_2 - (Y)_m - Z - NH$ -基 (A_2 はC2-C4アルケニル基、又は、C1-C4アルコキシ基、C1-C4アルコキシカルボニル基、カルボキシ基若しくはシアノ基で置換されたC1-C4アルキル基を表し、 Y は酸素原子又はNH基を表し、 Z はカルボニル基又はスルホニル基を表し、 m は0又は1を表す。) 又は $A_3 - NHCO$ -基 (A_3 はメタンスルホニル基、又は、水酸基、C1-C4アルコキシ基、C1-C4アルコキシカルボニル基、カルボキシ基若しくはシアノ基で置換されたC1-C4アルキル基を表す。)) を表し、 A は水酸基、C1-C4アルコキシ基、C2-C4アルケニルオキシ基、C2-C4アルキニルオキシ基、C1-C4アルキルアミノ基、C2-C4アルケニルアミノ基、C2-C4アルキニルアミノ基、モルホリノ基又はピペリジノ基を表す。]

で示される2H-1-ベンゾピラン-2-オン化合物。

【請求項 3】

式 (III)



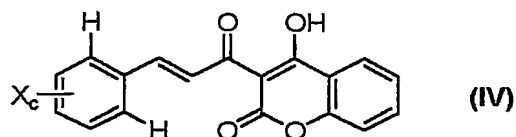
[式中、 X_b はC2-C4アルケニル基、C2-C4アルキニル基又はシアノ基のいずれかの置換基で置換されたC1-C4アルコキシ基、 $A_4 - CONH$ -基 (A_4 はC1-C4アルコキシ基で置換

されたC1-C4アルキル基を表す。)又は $A_5-NHCO-$ 基(A_5 は水酸基、C1-C4アルコキシ基又はC1-C4アルコキシカルボニル基のいずれかの置換基で置換されたC1-C4アルキル基を表す。)を表し、Aは水酸基、C1-C4アルコキシ基、C2-C4アルケニルオキシ基、C2-C4アルキニルオキシ基、C1-C4アルキルアミノ基、C2-C4アルケニルアミノ基、C2-C4アルキニルアミノ基、モルホリノ基又はピペリジノ基を表す。]

で示される2H-1-ベンゾピラン-2-オン化合物。

【請求項4】

式(IV)

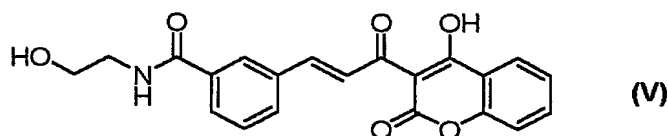


[式中、 X_c はアリルオキシ基、プロパルギルオキシ基、シアノメトキシ基、メトキシアセチルアミノ基、2-メトキシエチルアミノカルボニル基、2-ヒドロキシエチルアミノカルボニル基又はメトキシカルボニルメチルアミノカルボニル基を表す。]

で示される2H-1-ベンゾピラン-2-オン化合物。

【請求項5】

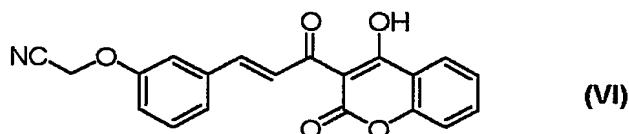
式(V)



で示される2H-1-ベンゾピラン-2-オン化合物。

【請求項6】

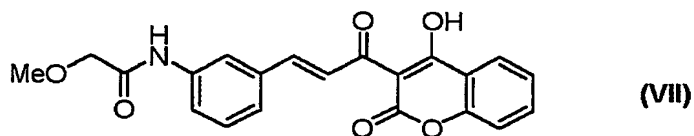
式(VI)



で示される2H-1-ベンゾピラン-2-オン化合物。

【請求項7】

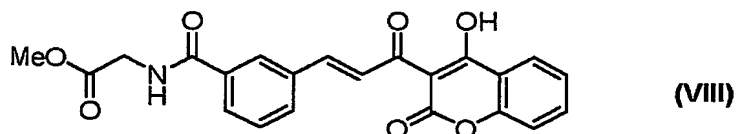
式(VII)



で示される2H-1-ベンゾピラン-2-オン化合物。

【請求項8】

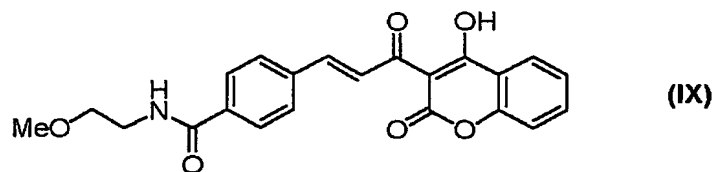
式(VIII)



で示される2H-1-ベンゾピラン-2-オン化合物。

【請求項9】

式 (IX)



で示される 2H-1-ベンゾピラン-2-オン化合物。

【請求項 10】

式 (X)



[式中、 X_d はメトキシアセチルアミノ基又はメトキシカルボニルメチルアミノカルボニルを表す。]、又は、式 (X')

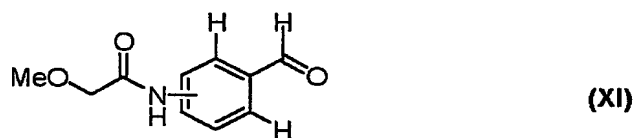


[式中、 X'_d は 2-メトキシエチルアミノカルボニル基を表す。]

で示されるベンズアルデヒド誘導体。

【請求項 11】

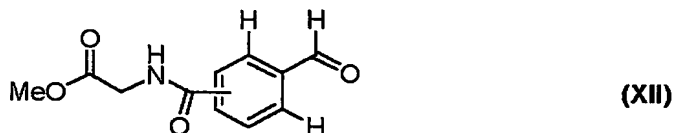
式 (XI)



で示されるベンズアルデヒド誘導体。

【請求項 12】

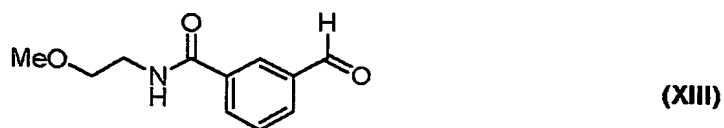
式 (XII)



で示されるベンズアルデヒド誘導体。

【請求項 13】

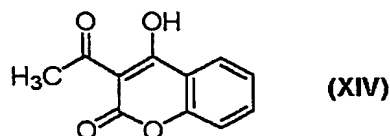
式 (XIII)



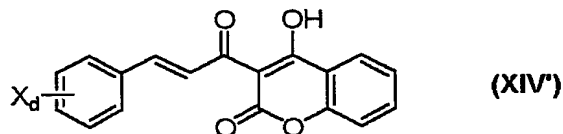
で示されるベンズアルデヒド誘導体。

【請求項 14】

請求項 10 記載のベンズアルデヒド誘導体と、式 (XIV)

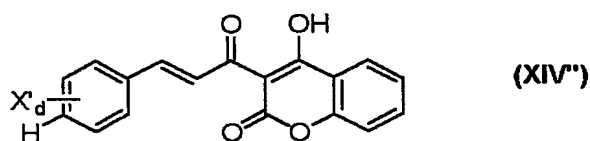


で示される化合物とを反応させることを特徴とする、式 (XIV')



[式中、X_d はメトキシアセチルアミノ基又はメトキシカルボニルメチルアミノカルボニルを表す。]

又は、式 (XIV'')

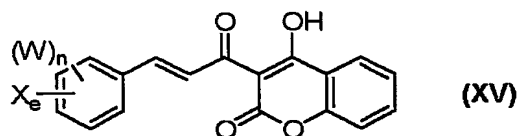


[式中、X_d はメトキシアセチルアミノ基又はメトキシカルボニルメチルアミノカルボニルを表す。]

で示される2H-1-ベンゾピラン-2-オン化合物の製造法。

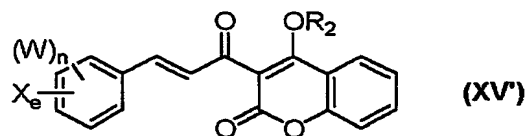
【請求項 15】

式 (XV)



[式中、X_e はシアノ基で置換されたC2-C4アルケニル基、A'₁-R₁-O-基 (A'₁ はC1-C4アルキルチオ基、C2-C4アルケニル基、C2-C4アルキニル基、C1-C4アルコキシカルボニル基又はシアノ基を表し、R₁ はC1-C4アルキレン基を表す。)、A'₂-(Y)_m-Z-NH-基 (A'₂ はC2-C4アルケニル基、又は、C1-C4アルコキシ基、C1-C4アルコキシカルボニル基若しくはシアノ基で置換されたC1-C4アルキル基を表し、Yは酸素原子又はNH基を表し、Zはカルボニル基又はスルホニル基を表し、mは0又は1を表す。) 又はA'₃-NHCO-基 (A'₃ はメタンスルホニル基、又は、水酸基、C1-C4アルコキシ基、C1-C4アルコキシカルボニル基若しくはシアノ基で置換されたC1-C4アルキル基を表す。) を表し、Wはハロゲン原子、ニトロ基、C1-C4アルキル基又はC1-C4アルコキシ基を表し、nは0、1又は2を表し、nが2の場合にはWは相異なってよい。]

で示される化合物をアルキル化、アルケニル化又はアルキニル化することを特徴とする、式 (XV')

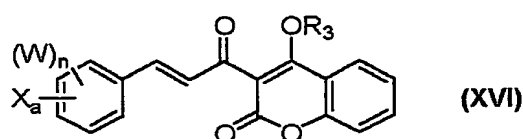


[式中、X_e、Wおよびnは前記と同一の意味を表し、R₂はC1-C4アルキル基、C2-C4アルケニル基又はC2-C4アルキニル基を表す。]

で示される2H-1-ベンゾピラン-2-オン化合物の製造法。

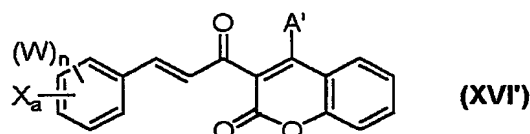
【請求項 16】

式 (XVI)



[式中、 X_a はシアノ基で置換されたC2-C4アルケニル基、 $A_1 - R_1 - O$ -基 (A_1 は、C1-C4アルキルチオ基、C2-C4アルケニル基、C2-C4アルキニル基、C1-C4アルコキシカルボニル基、カルボキシ基又はシアノ基を表し、 R_1 はC1-C4アルキレン基を表す。)、 $A_2 - (Y)_m - Z - NH$ -基 (A_2 はC2-C4アルケニル基、又は、C1-C4アルコキシ基、C1-C4アルコキシカルボニル基、カルボキシ基若しくはシアノ基で置換されたC1-C4アルキル基を表し、 Y は酸素原子又はNH基を表し、 Z はカルボニル基又はスルホニル基を表し、 m は0又は1を表す。) 又は $A_3 - NHCO$ -基 (A_3 はメタンスルホニル基、又は、水酸基、C1-C4アルコキシ基、C1-C4アルコキシカルボニル基、カルボキシ基若しくはシアノ基で置換されたC1-C4アルキル基を表す。) を表し、 W はハロゲン原子、ニトロ基、C1-C4アルキル基又はC1-C4アルコキシ基を表し、 n は0、1又は2を表し、 n が2の場合には W は相異なっており、 R_3 は水素原子又はメチル基を表す。]

で示される化合物をアミノ化することを特徴とする、式 (XVI')



[式中、 X_a 、 W および n は前記と同一の意味を表し、 A' はC1-C4アルキルアミノ基、C2-C4アルケニルアミノ基、C2-C4アルキニルアミノ基、モルホリノ基又はピペリジノ基を表す。]

で示される2H-1-ベンゾピラン-2-オン化合物の製造法。

【請求項17】

I型コラーゲン遺伝子の転写を抑制するための有効成分としての、請求項1記載の2H-1-ベンゾピラン-2-オン化合物の使用。

【請求項18】

請求項1記載の2H-1-ベンゾピラン-2-オン化合物と不活性担体とを含有することを特徴とするI型コラーゲン遺伝子転写抑制組成物。

【請求項19】

I型コラーゲン遺伝子の発現量を減少させてコラーゲン蓄積量の低下を導くことにより組織の線維化を改善するための有効成分としての、請求項1記載の2H-1-ベンゾピラン-2-オン化合物の使用。

【請求項20】

請求項1記載の2H-1-ベンゾピラン-2-オン化合物と不活性担体とを含有することを特徴とする組織線維化改善組成物。

【請求項21】

有効量の請求項1記載の2(1H)-キノリノン化合物を、組織の線維化を改善させる処置を必要とする哺乳動物患者に投与することを特徴とする組織線維化改善方法。

【請求項22】

TGF- β の作用を抑制するための有効成分としての、請求項1記載の2H-1-ベンゾピラン-2-オン化合物の使用。

【請求項23】

請求項1記載の2H-1-ベンゾピラン-2-オン化合物と不活性担体とを含有することを特徴とするTGF- β 作用抑制組成物。

【請求項24】

TGF- β による毛髪退行期への移行促進を阻害して毛髪成長期の延長を導くことによ

り養毛効果を得るための有効成分としての、請求項 1 記載の 2(1H)-キノリノン化合物の使用。

【請求項 25】

請求項 1 記載の 2H-1-ベンゾピラン-2-オン化合物と不活性担体とを含有することを特徴とする養毛組成物。

【請求項 26】

有効量の請求項 1 記載の 2H-1-ベンゾピラン-2-オン化合物を、養毛処置を必要とする哺乳動物患者に投与することを特徴とする養毛方法。

【請求項 27】

慢性腎不全を治療するための有効成分としての、請求項 1 記載の 2H-1-ベンゾピラン-2-オン化合物の使用。

【請求項 28】

請求項 1 記載の 2H-1-ベンゾピラン-2-オン化合物と不活性担体とを含有することを特徴とする慢性腎不全治療剤。

【書類名】明細書

【発明の名称】2H-1-ベンゾピラン-2-オン化合物及びその用途

【技術分野】

【0001】

本発明は、2H-1-ベンゾピラン-2-オン化合物及びその利用に関する。

【背景技術】

【0002】

肝硬変、間質性肺疾患、慢性腎不全（又は慢性腎不全に陥る疾患）、炎症後の過形成痕跡、術後の癒痕や熱傷性癒痕、強皮症、動脈硬化、高血圧等の疾患や異状においては、コラーゲンに代表されるような細胞外マトリックスの過度の集積により組織が線維化して硬化し、その結果、臓器・組織の機能低下や癒痕形成等に至る。このような細胞外マトリックスの過度の集積は、コラーゲン等の生合成と分解とのバランスの破綻に基づくコラーゲンの産生亢進により導かれる。実際、線維化した組織においては、コラーゲン遺伝子、特にI型コラーゲン遺伝子の発現量が増加していることが観察されている（例えば、非特許文献1及び非特許文献2参照）。また、線維化した組織においては、サイトカインの1種であるTGF- β の量が上昇していることも観察されている（例えば、非特許文献1及び非特許文献2参照）。TGF- β は、I型コラーゲン遺伝子の発現量を増加させ、コラーゲンの産生亢進、ひいては、組織の線維化に関与していることが示されている（例えば、非特許文献3及び非特許文献4参照）。さらに、組織線維化のモデル動物に対し、抗TGF- β 抗体や可溶性抗TGF- β 受容体を投与することにより、組織の線維化が改善され、それに伴い組織機能が改善されることが明らかにされており（例えば、非特許文献5、非特許文献6及び非特許文献7参照）、またTGF- β の細胞内シグナル伝達に対して抑制的に働く化合物を投与することにより、組織の線維化が改善され、それに伴い組織機能が改善されることも知られている（例えば、非特許文献8、非特許文献9及び非特許文献10参照）。

【0003】

【非特許文献1】J. Invest. Dermatol., 94, 365, (1990)

【非特許文献2】Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 6642, (1991)

【非特許文献3】Lab. Invest., 63, 171, (1990)

【非特許文献4】J. Invest. Dermatol., 94, 365, (1990)

【非特許文献5】Diabetes, 45, 522-530, (1996)

【非特許文献6】Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96, 12719-12724, (1999)

【非特許文献7】Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97, 8015-8020, (2000)

【非特許文献8】Autoimmunity, 35, 277-282, (2002)

【非特許文献9】J. Hepatol., 37, 331-339, (2002)

【非特許文献10】Life Sci., 71, 1559-1606, (2002)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

そこで、組織におけるI型コラーゲン遺伝子の発現量を減少させ、コラーゲン蓄積量を低下させることにより、組織の線維化を改善させる薬剤（即ち、コラーゲン蓄積抑制剤や線維症治療剤）の開発・提供が切望されている。

【課題を解決するための手段】

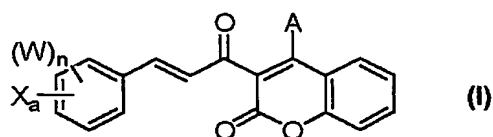
【0005】

本発明者らは、かかる状況の下、鋭意検討した結果、下記の式（I）で示される2H-1-

ベンゾピラン-2-オン化合物が I 型コラーゲン遺伝子の転写を抑制する能力を有することを見出し、本発明に至った。

即ち、本発明は、

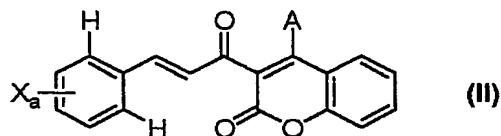
1. 式 (I)



[式中、 X_a はシアノ基で置換された C2-C4 アルケニル基、 $A_1 - R_1 - O$ - 基 (A_1 は、C1-C4 アルキルチオ基、C2-C4 アルケニル基、C2-C4 アルキニル基、C1-C4 アルコキシカルボニル基、カルボキシ基又はシアノ基を表し、 R_1 は C1-C4 アルキレン基を表す。)、 $A_2 - (Y)_m - Z - NH$ - 基 (A_2 は C2-C4 アルケニル基、又は、C1-C4 アルコキシ基、C1-C4 アルコキシカルボニル基、カルボキシ基若しくはシアノ基で置換された C1-C4 アルキル基を表し、 Y は酸素原子又は NH 基を表し、 Z はカルボニル基又はスルホニル基を表し、 m は 0 又は 1 を表す。) 又は $A_3 - NHCO$ - 基 (A_3 はメタンスルホニル基、又は、水酸基、C1-C4 アルコキシ基、C1-C4 アルコキシカルボニル基、カルボキシ基若しくはシアノ基で置換された C1-C4 アルキル基を表す。) を表し、 W はハロゲン原子、ニトロ基、C1-C4 アルキル基又は C1-C4 アルコキシ基を表し、 n は 0、1 又は 2 を表し、 n が 2 の場合には W は相異なってよく、 A は水酸基、C1-C4 アルコキシ基、C2-C4 アルケニルオキシ基、C2-C4 アルキニルオキシ基、C1-C4 アルキルアミノ基、C2-C4 アルケニルアミノ基、C2-C4 アルキニルアミノ基、モルホリノ基又はピペリジノ基を表す。]

で示される 2H-1-ベンゾピラン-2-オン化合物 (以下、本発明化合物 (I) と記すこともある。);

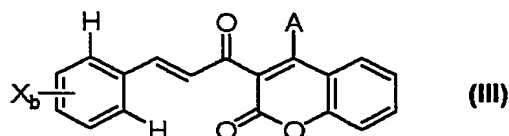
2. 式 (II)



[式中、 X_a はシアノ基で置換された C2-C4 アルケニル基、 $A_1 - R_1 - O$ - 基 (A_1 は、C1-C4 アルキルチオ基、C2-C4 アルケニル基、C2-C4 アルキニル基、C1-C4 アルコキシカルボニル基、カルボキシ基又はシアノ基を表し、 R_1 は C1-C4 アルキレン基を表す。)、 $A_2 - (Y)_m - Z - NH$ - 基 (A_2 は C2-C4 アルケニル基、又は、C1-C4 アルコキシ基、C1-C4 アルコキシカルボニル基、カルボキシ基若しくはシアノ基で置換された C1-C4 アルキル基を表し、 Y は酸素原子又は NH 基を表し、 Z はカルボニル基又はスルホニル基を表し、 m は 0 又は 1 を表す。) 又は $A_3 - NHCO$ - 基 (A_3 はメタンスルホニル基、又は、水酸基、C1-C4 アルコキシ基、C1-C4 アルコキシカルボニル基、カルボキシ基若しくはシアノ基で置換された C1-C4 アルキル基を表す。) を表し、 A は水酸基、C1-C4 アルコキシ基、C2-C4 アルケニルオキシ基、C2-C4 アルキニルオキシ基、C1-C4 アルキルアミノ基、C2-C4 アルケニルアミノ基、C2-C4 アルキニルアミノ基、モルホリノ基又はピペリジノ基を表す。]

で示される 2H-1-ベンゾピラン-2-オン化合物;

3. 式 (III)

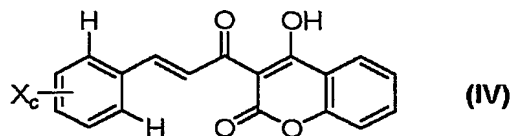


[式中、 X_b は C2-C4 アルケニル基、C2-C4 アルキニル基又はシアノ基のいずれかの置換基で置換された C1-C4 アルコキシ基、 $A_4 - CONH$ - 基 (A_4 は C1-C4 アルコキシ基で置換

されたC1-C4アルキル基を表す。)又はA₅-NHCO-基(A₅は水酸基、C1-C4アルコキシ基又はC1-C4アルコキシカルボニル基のいずれかの置換基で置換されたC1-C4アルキル基を表す。)を表し、Aは水酸基、C1-C4アルコキシ基、C2-C4アルケニルオキシ基、C2-C4アルキニルオキシ基、C1-C4アルキルアミノ基、C2-C4アルケニルアミノ基、C2-C4アルキニルアミノ基、モルホリノ基又はピペリジノ基を表す。]

で示される2H-1-ベンゾピラン-2-オン化合物;

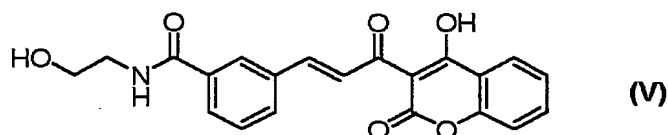
4. 式 (IV)



[式中、X_c はアリルオキシ基、プロパルギルオキシ基、シアノメトキシ基、メトキシアセチルアミノ基、2-メトキシエチルアミノカルボニル基、2-ヒドロキシエチルアミノカルボニル基又はメトキシカルボニルメチルアミノカルボニル基を表す。]

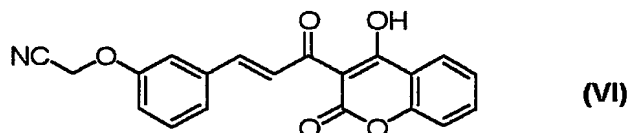
で示される2H-1-ベンゾピラン-2-オン化合物;

5. 式 (V)



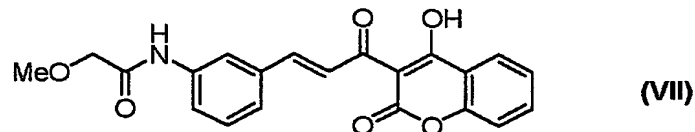
で示される2H-1-ベンゾピラン-2-オン化合物;

6. 式 (VI)



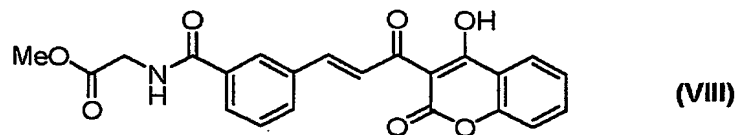
で示される2H-1-ベンゾピラン-2-オン化合物;

7. 式 (VII)



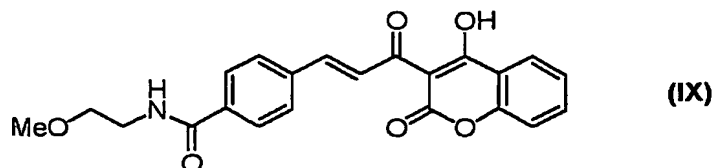
で示される2H-1-ベンゾピラン-2-オン化合物;

8. 式 (VIII)



で示される2H-1-ベンゾピラン-2-オン化合物;

9. 式 (IX)



で示される 2H-1-ベンゾピラン-2-オン化合物；

10. 式 (X)



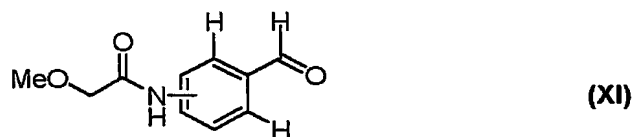
[式中、 X_d はメトキシアセチルアミノ基又はメトキシカルボニルメチルアミノカルボニルを表す。]、又は、式 (X')



[式中、 X'_d は 2-メトキシエチルアミノカルボニル基を表す。]

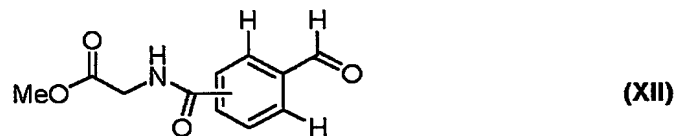
で示されるベンズアルデヒド誘導体；

11. 式 (XI)



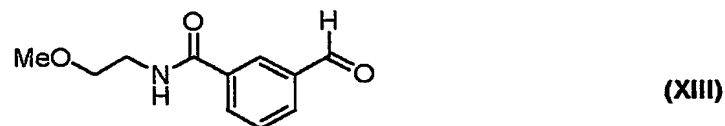
で示されるベンズアルデヒド誘導体；

12. 式 (XII)



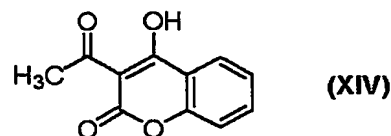
で示されるベンズアルデヒド誘導体；

13. 式 (XIII)

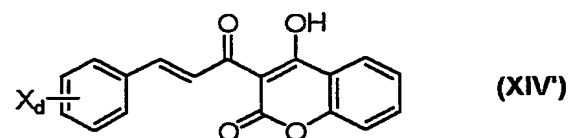


で示されるベンズアルデヒド誘導体；

14. 前項 10 記載のベンズアルデヒド誘導体と、式 (XIV)

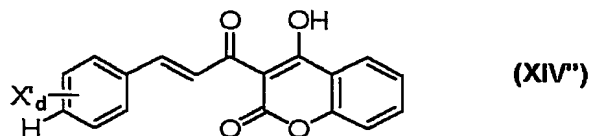


で示される化合物とを反応させることを特徴とする、式 (XIV')



[式中、 X_d はメトキシアセチルアミノ基又はメトキシカルボニルメチルアミノカルボニルを表す。]

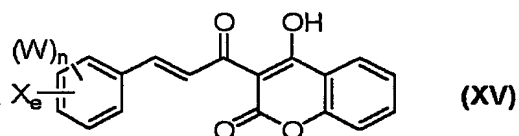
又は、式 (XIV'))



[式中、 X_d はメトキシアセチルアミノ基又はメトキシカルボニルメチルアミノカルボニルを表す。]

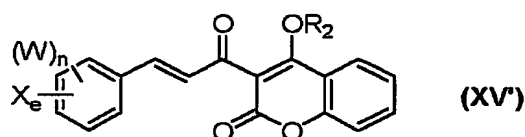
で示される2H-1-ベンゾピラン-2-オン化合物の製造法；

15. 式 (XV)



[式中、 X_e はシアノ基で置換されたC2-C4アルケニル基、 $A'_1 - R_1 - O$ -基 (A'_1 はC1-C4アルキルチオ基、C2-C4アルケニル基、C2-C4アルキニル基、C1-C4アルコキシカルボニル基又はシアノ基を表し、 R_1 はC1-C4アルキレン基を表す。)、 $A'_2 - (Y)_m - Z - NH$ -基 (A'_2 はC2-C4アルケニル基、又は、C1-C4アルコキシ基、C1-C4アルコキシカルボニル基若しくはシアノ基で置換されたC1-C4アルキル基を表し、 Y は酸素原子又はNH基を表し、 Z はカルボニル基又はスルホニル基を表し、 m は0又は1を表す。) 又は $A'_3 - NHCO$ -基 (A'_3 はメタンスルホニル基、又は、水酸基、C1-C4アルコキシ基、C1-C4アルコキシカルボニル基若しくはシアノ基で置換されたC1-C4アルキル基を表す。) を表し、 W はハロゲン原子、ニトロ基、C1-C4アルキル基又はC1-C4アルコキシ基を表し、 n は0、1又は2を表し、 n が2の場合には W は相異なってよい。]

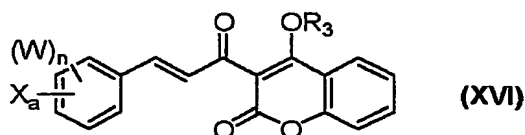
で示される化合物をアルキル化、アルケニル化又はアルキニル化することを特徴とする、式 (XV')



[式中、 X_e 、 W および n は前記と同一の意味を表し、 R_2 はC1-C4アルキル基、C2-C4アルケニル基又はC2-C4アルキニル基を表す。]

で示される2H-1-ベンゾピラン-2-オン化合物の製造法；

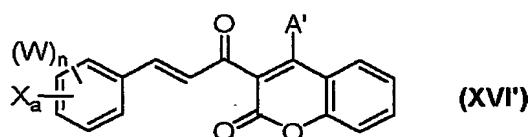
16. 式 (XVI)



[式中、 X_a はシアノ基で置換されたC2-C4アルケニル基、 $A_1 - R_1 - O$ -基 (A_1 は、C1-C4アルキルチオ基、C2-C4アルケニル基、C2-C4アルキニル基、C1-C4アルコキシカルボニル基、カルボキシ基又はシアノ基を表し、 R_1 はC1-C4アルキレン基を表す。)、 $A_2 - (Y)_m - Z - NH$ -基 (A_2 はC2-C4アルケニル基、又は、C1-C4アルコキシ基、C1-C4アルコキシカルボニル基、カルボキシ基若しくはシアノ基で置換されたC1-C4アルキル基を表し、 Y は酸素原子又はNH基を表し、 Z はカルボニル基又はスルホニル基を表し、 m は0又は1を表す。) 又は $A_3 - NHCO$ -基 (A_3 はメタンスルホニル基、又は、水酸基、C1-C4アルコキシ基、C1-C4アルコキシカルボニル基、カルボキシ基若しくはシアノ

基で置換されたC1-C4アルキル基を表す。)を表し、Wはハロゲン原子、ニトロ基、C1-C4アルキル基又はC1-C4アルコキシ基を表し、nは0、1又は2を表し、nが2の場合にはWは相異なっており、R₃は水素原子又はメチル基を表す。]

で示される化合物をアミノ化することを特徴とする、式 (XVI')



[式中、X_a、Wおよびnは前記と同一の意味を表し、A'はC1-C4アルキルアミノ基、C2-C4アルケニルアミノ基、C2-C4アルキニルアミノ基、モルホリノ基又はピペリジノ基を表す。]

で示される2H-1-ベンゾピラン-2-オン化合物の製造法;

17. I型コラーゲン遺伝子の転写を抑制するための有効成分としての、前項1記載の2H-1-ベンゾピラン-2-オン化合物の使用;

18. 前項1記載の(有効成分としての)2H-1-ベンゾピラン-2-オン化合物と不活性担体とを含有することを特徴とするI型コラーゲン遺伝子転写抑制組成物(以下、本発明転写抑制組成物と記すこともある。);

19. I型コラーゲン遺伝子の発現量を減少させてコラーゲン蓄積量の低下を導くことにより組織の線維化を改善するための有効成分としての、前項1記載の2H-1-ベンゾピラン-2-オン化合物の使用;

20. 前項1記載の(有効成分としての)2H-1-ベンゾピラン-2-オン化合物と不活性担体とを含有することを特徴とする組織線維化改善組成物(以下、本発明線維化改善組成物と記すこともある。);

21. 有効量の請求項1記載の2(1H)-キノリノン化合物を、組織の線維化を改善させる処置を必要とする哺乳動物患者に投与することを特徴とする組織線維化改善方法;

22. TGF-βの作用を抑制するための有効成分としての、請求項1記載の2H-1-ベンゾピラン-2-オン化合物の使用;

23. 請求項1記載の(有効成分としての)2H-1-ベンゾピラン-2-オン化合物と不活性担体とを含有することを特徴とするTGF-β作用抑制組成物;

24. TGF-βによる毛髪退行期への移行促進を阻害して毛髪成長期の延長を導くことにより養毛効果を得るための有効成分としての、前項1記載の2(1H)-キノリノン化合物の使用;

25. 前項1記載の(有効成分としての)2H-1-ベンゾピラン-2-オン化合物と不活性担体とを含有することを特徴とする養毛組成物(以下、本発明養毛組成物と記すこともある。);

26. 有効量の請求項1記載の2H-1-ベンゾピラン-2-オン化合物を、養毛処置を必要とする哺乳動物患者に投与することを特徴とする養毛方法;

27. 慢性腎不全を治療するための有効成分としての、前項1記載の2H-1-ベンゾピラン-2-オン化合物の使用;

28. 前項1記載の(有効成分としての)2H-1-ベンゾピラン-2-オン化合物と不活性担体とを含有することを特徴とする慢性腎不全治療剤;

等を提供するものである。

【発明の効果】

【0006】

本発明により、組織におけるI型コラーゲン遺伝子の発現量を減少させ、コラーゲン蓄積量を低下させることにより、組織の線維化を改善させる組成物(即ち、コラーゲン蓄積抑制剤や線維症治療剤)等の開発・提供が可能となる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0007】

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明において、

前記の X_a における C2-C4 アルケニル基としては、例えば、ビニル基、プロペニル基等があげられ、C1-C4 アルキルチオ基としては、例えば、メチルチオ基等があげられ、C2-C4 アルキニル基としては、例えば、エチニル基、プロピニル基等があげられ、C1-C4 アルコキシカルボニル基としては、例えば、メトキシカルボニル基、エトキシカルボニル基等があげられ、C1-C4 アルキレン基としては、例えば、メチレン基、エチレン基等があげられ、C1-C4 アルキル基としては、例えば、メチル基、エチル基等があげられ、C1-C4 アルコキシ基としては、例えば、メトキシ基、エトキシ基等があげられる。

X_a における、シアノで置換された C2-C4 アルケニル基としては、例えば、2-シアノビニル基等があげられる。

X_a における、 $A_1 - R_1 - O$ -基としては、例えば、2-メチルチオエトキシ基、アリルオキシ基、プロパルギルオキシ基、メトキシカルボニルメトキシ基、シアノメトキシ基等があげられる。

X_a における、 $A_2 - (Y)_m - Z - NH$ -基としては、例えば、アクリロイルアミノ基、メトキシアセトアミド基、2-メトキシエトキシカルボニルアミノ基、3-(2-メトキシエチル)ウレイド基、メトキシカルボニルメタンスルホニル基、シアノアセトアミド基等があげられる。

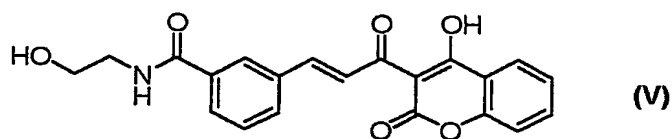
X_a における、一般式 $A_3 - NHCO$ -基としては、例えば、メタンスルホニルアミノカルボニル基、2-メトキシエチルアミノカルボニル基、メトキシカルボニルメチルアミノカルボニル基、シアノメチルアミノカルボニル基等があげられる。

前記の A における、C2-C4 アルケニルオキシ基としては、例えば、アリルオキシ基等があげられ、C2-C4 アルキニルオキシ基としては、例えば、プロパルギルオキシ基等があげられ、C1-C4 アルキルアミノ基としては、例えば、メチルアミノ基、イソプロピルアミノ基等があげられ、C2-C4 アルケニルアミノ基としては、例えば、アリルアミノ等があげられ、C2-C4 アルキニルアミノ基としては、例えば、プロパルギルアミノ等があげられる。

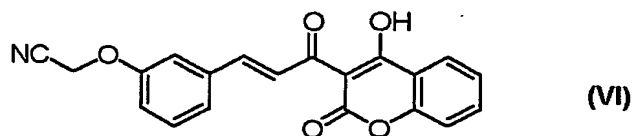
前記の W におけるハロゲン原子としては、フッ素原子、塩素原子、臭素原子及びヨウ素原子があげられる。

【0008】

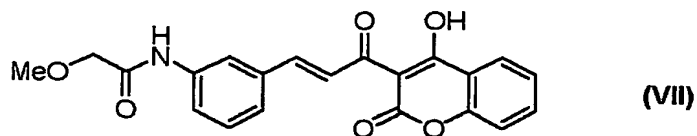
本発明化合物 (I) のうち、典型的な化合物の例として、式 (V)



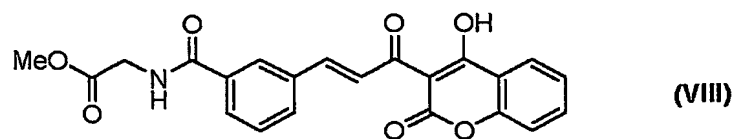
で示される 2H-1-ベンゾピラン-2-オン化合物、式 (VI)



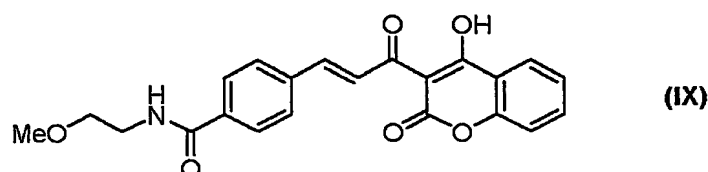
で示される 2H-1-ベンゾピラン-2-オン化合物、式 (VII)



で示される2H-1-ベンゾピラン-2-オン化合物、
式 (VIII)



で示される2H-1-ベンゾピラン-2-オン化合物、
式 (IX)

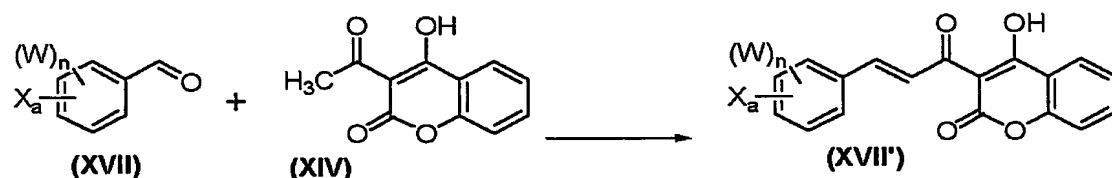


で示される2H-1-ベンゾピラン-2-オン化合物、
等を挙げることができる。

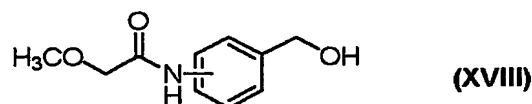
【0009】

〔本発明化合物 (I) の製造法 A〕

本発明化合物 (I) のうち、式 (XVII') (式中、 X_a 、W 及び n は前記と同一の意味を表す。) で示される化合物は、式 (XVII) (式中、 X_a 、W 及び n は前記と同一の意味を表す。) で示される化合物と、式 (XIV) で示される化合物とを反応させる (特開昭 50-46666 号公報 参照) ことにより製造することができる。

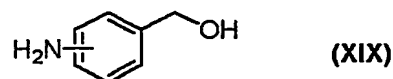


式 (XVII) で示される化合物の一部は、例えば、EP 330645 等の文献に記載されており公知であるが、前記の式 (X) 又は式 (X') で示されるベンズアルデヒド誘導体は、これまで報告された例はなく、新規物質である。ベンズアルデヒド誘導体 (X) は、例えば、式 (XVIII)



で示される化合物を、ジクロロメタン中でトリエチルアミン等の塩基の存在下、塩化オキザリルで活性化されたジメチルスルホキシドを用いて酸化する (SYNTHESIS (1981), 165) ことで製造することができる。

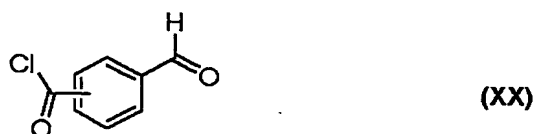
式 (XVIII) で示される化合物は、例えば、式 (XIX)



で示される化合物を、メトキシアセチルクロリドと反応させることで製造することができる。当該反応において、反応温度の範囲は、通常、室温～溶媒還流温度であり、反応時間の範囲は、通常、瞬時～約 24 時間である。等該反応は、通常、塩基の存在下で行うが、用いられる塩基としては、ピリジン、トリエチルアミン、N, N-ジメチルアニリン、トリブチルアミン、N-メチルモルホリン等の有機塩基、水酸化ナトリウム、水酸化カリウ

ム、炭酸カリウム等の無機塩基等があげられる。当該反応に供せられる試剤の量は、式 (XIX) で示される化合物 1 モルに対して、メトキシアセチルクロリドは通常 1 ~ 2 モル、塩基は通常 1 ~ 7 モルである。上記反応において、溶媒は必ずしも必要ではないが、通常は溶媒の存在下に行われる。当該反応に使用しうる溶媒としては、ヘキサン、石油エーテル等の脂肪族炭化水素類、ベンゼン、トルエン等の芳香族炭化水素類、クロロホルム、ジクロロエタン等のハロゲン化炭化水素類、ジエチルエーテル、ジオキサン、テトラヒドロフラン等のエーテル類、アセトン、メチルエチルケトン等のケトン類、酢酸エチル、炭酸ジエチル等のエステル類、アセトニトリル、イソブチルニトリル等のニトリル類、ホルムアミド、N, N-ジメチルホルムアミド等のアミド類、ジメチルスルホキシド等の硫黄化合物類等又はそれらの混合物があげられる。反応終了後の反応液は、有機溶媒抽出、水洗後、有機層を減圧濃縮する等の通常の後処理を行い、必要に応じ、クロマトグラフィー、再結晶等の操作によって精製することにより、目的の本発明化合物を得ることができる。

ベンズアルデヒド誘導體 (X) 又は (X') は、例えば、式 (XX)



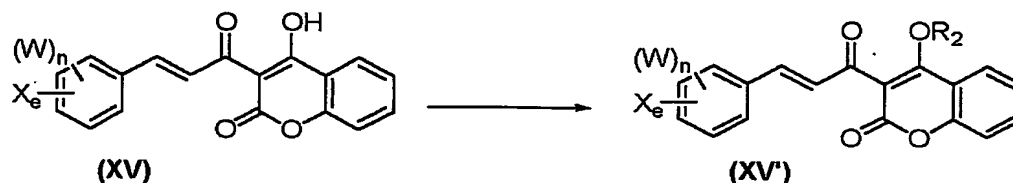
で示される化合物を、グリシン メチルエステル又は2-メトキシエチルアミンと反応させることで製造することができる。化合物 (XX) とグリシン メチルエステル又は2-メトキシエチルアミンとの反応は、前記の化合物 (XIX) とメトキシアセチルクロリドとの反応と、同様にして行うことができる。

化合物 (XX) は、例えば、J. Medicinal Chem. (2001), 44, 362 等の文献に記載されており公知である。

本発明化合物 (I) のうち、前記の式 (XIV') 又は (XIV'') で示される 2H-1-ベンゾピラン-2-オン化合物は、ベンズアルデヒド誘導體 (X) 又は (X') と、前記の化合物 (XIV) とを反応させることにより、製造することができる。

〔本発明化合物 (I) の製造法 B〕

本発明化合物 (I) のうち、前記の式 (XV') で示される 2H-1-ベンゾピラン-2-オン化合物は、式 (XV) で示される化合物をアルキル化、アルケニル化又はアルキニル化することにより製造することができる。



アルキル化、アルケニル化又はアルキニル化の方法としては、例えば、化合物 (XV) と式 (XV'')



〔式中、R₂は前記と同一の意味を表し、Vは脱離基を表す。〕

で示されるアルキル化剤、アルケニル化剤又はアルキニル化剤とを塩基の存在下で反応させる方法をあげることができる。

化合物 (XV) と化合物 (XV'') との塩基の存在下での反応は、通常、溶媒中で行われる。反応に用いられる溶媒としては、例えば、N, N-ジメチルホルムアミド、N, N-ジメチルアセトアミド等の酸アミド類、ジメチルスルホキシド等のスルホキシド類、ヘキサメチルホスホラミド等のリン酸アミド化合物類、アセトン、メチルエチルケトン等のケトン類等があげられる。

反応に用いられる塩基としては、例えば、水素化ナトリウム、水素化カリウム等のアル

カリ金属水素化物類、炭酸ナトリウム、炭酸カリウム等のアルカリ金属の炭酸塩類、酸化銀等があげられる。

反応に用いられるアルキル化剤、アルケニル化剤又はアルキニル化剤としては、例えば、メタンスルホン酸メチル等のアルキルスルホン酸エステル類、p-トルエンスルホン酸メチル等のアリールスルホン酸エステル類、ジメチル硫酸等の硫酸エステル類、ヨウ化メチル、臭化アリル、臭化プロパルギル等のハライド類があげられる。

反応に用いられる試剤の量は、化合物 (XV) 1 モルに対して、塩基は、通常、1 モル～2 モルの割合、化合物 (XV'') は、通常、1 モル～2 モルの割合である。

反応温度は、通常、0℃～100℃の範囲内、反応時間は、通常、1時間～200時間の範囲内である。

反応終了後、反応混合物を有機溶媒抽出し、有機層を乾燥、濃縮する等の後処理操作を行うことにより、2H-1-ベンゾピラン-2-オン化合物 (XV') を単離することができる。単離された化合物 (XV') はクロマトグラフィー、再結晶等によりさらに精製することもできる。

アルキル化、アルケニル化又はアルキニル化の方法としては、例えば、化合物 (XV) と式 (XV''')



[式中、R₂は前記と同一の意味を表す。]

で示されるアルコール類とを、アゾジカルボン酸ジエチル及びトリフェニルホスフィンの存在下で反応させる方法をあげることができる。

化合物 (XV) とアルコール類 (XV''') とのアゾジカルボン酸ジエチル及びトリフェニルホスフィンの存在下での反応は、通常、溶媒中で行われる。反応に用いられる溶媒としては、例えば、テトラヒドロフラン、ジエチルエーテル等のエーテル類等があげられる。

反応に用いられるアルコール類 (XV''') としては、メタノール、アリルアルコール、プロパルギルアルコール等があげられる。

反応に用いられる試剤の量は、化合物 (XV) 1 モルに対して、アゾジカルボン酸ジエチル及びトリフェニルホスフィン、通常、1 モル～2 モルの割合、アルコール類 (XV''') は、通常、1 モル～10 モルの割合である。

反応温度は、通常、0℃～100℃の範囲内、反応時間は、通常、1時間～200時間の範囲内である。

[本発明化合物 (I) の製造法 C]

本発明化合物 (I) のうち、前記の式 (XVI') で示される 2H-1-ベンゾピラン-2-オン化合物は、前記の式 (XVI) で示される 2H-1-ベンゾピラン-2-オン化合物をアミノ化することにより、製造することができる。

2H-1-ベンゾピラン-2-オン化合物 (XVI) のアミノ化は、通常、溶媒中で行われる。反応に用いられる溶媒としては、例えば、N, N-ジメチルホルムアミド、N, N-ジメチルアセトアミド等の酸アミド類、ジメチルスルホキシド等のスルホキシド類、ヘキサメチルホスホラミド等のリン酸アミド化合物類、アセトン、メチルエチルケトン等のケトン類等、メタノール、エタノール等のアルコール類等、ベンゼン、トルエン等の芳香族炭化水素類、ピリジン等の芳香族複素環類があげられる。

反応に用いられるアミノ化剤としては、例えば、メチルアミン、イソプロピルアミン等の飽和脂肪族アミン、アリルアミン、プロパルギルアミン等の不飽和脂肪族アミン、モルホリン、ピペリジン等があげられる。

反応に用いられる試剤の量は、化合物 (XVI) 1 モルに対して、アミノ化剤は、通常、1 モル～10 モルの割合である。

反応温度は、通常、0℃～100℃の範囲内、反応時間は、通常、1時間～200時間の範囲内である。

反応終了後、反応混合物を有機溶媒抽出し、有機層を乾燥、濃縮する等の後処理操作を行うことにより、2H-1-ベンゾピラン-2-オン化合物 (XVI') を単離することができる。単離された化合物 (XVI') はクロマトグラフィー、再結晶等によりさらに精製することもで

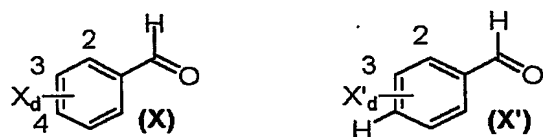
きる。また、反応液の冷却後、反応液から析出する不溶物を濾取することでも、2H-1-ベンゾピラン-2-オン化合物 (XVI') を単離することができる。

前記のとおり、2H-1-ベンゾピラン-2-オン化合物 (XVI) の R_3 が水素原子である化合物は、式 (XVII') で表される。化合物 (XVII') は、化合物 (XVII) と (XIV) とを反応させることにより製造することができる。従って、化合物 (XVII) と (XIV) との反応液中に生成した化合物 (XVII') を単離することなく、共存するアミノ化剤でアミノ化して化合物 (XVI') を製造することができる。この場合、反応時間を延長することで、反応液中に生成した化合物 (XVII') のアミノ化が進行し、化合物 (XVI') の収量を向上させることができる。

【0010】

表1に、化合物番号 (a) ~ (e) で表されるベンズアルデヒド誘導体(X)又は(X')を例示する。

表1 ベンズアルデヒド誘導体(X)又は(X')



【0011】

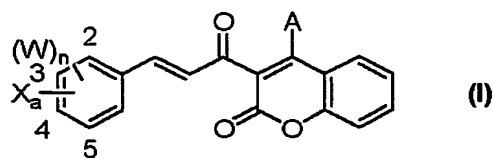
【表1】

化合物番号	X_d 又は X'_d	化合物番号	X_d 又は X'_d
(a)	3-NHCOCH ₂ OCH ₃	(d)	4-CONHCH ₂ COOCH ₃
(b)	4-NHCOCH ₂ OCH ₃	(e)	3-CONHCH ₂ CH ₂ OCH ₃
(c)	3-CONHCH ₂ COOCH ₃		

【0012】

表2に、化合物番号 (1) ~ (39) で表される本発明化合物 (I) を例示する。

表2 本発明化合物 (I)



【0013】

【表2】

化合物番号	X _a 及び (W) _n	A
(1)	3-CH=CHCN	-OH
(2)	3-CH=CHCN	-OCH ₃
(3)	3-CH=CHCN	-NHCH ₂ C≡CH
(4)	3-OCH ₂ CH ₂ SCH ₃	-OH
(5)	3-OCH ₂ CH=CH ₂	-OH
(6)	2-OCH ₂ C≡CH	-Piperidino
(7)	3-OCH ₂ C≡CH	-OH
(8)	3-OCH ₂ C≡CH	-OCH ₂ CH=CH ₂
(9)	4-OCH ₂ C≡CH	-OH
(10)	3-OCH ₂ COOCH ₃	-OH
(11)	3-OCH ₃ , 4-OCH ₂ COOCH ₃	-OH
(12)	3-OCH ₂ COOH	-OH
(13)	3-OCH ₂ CN	-OH
(14)	3-OCH ₂ CN	-OCH ₃
(15)	4-OCH ₂ CN	-OH
(16)	3-CH ₃ , 4-OCH ₂ CN	-OH
(17)	3-NO ₂ , 4-OCH ₂ CN	-OH
(18)	3-F, 4-OCH ₂ CN, 5-OCH ₃	-OH
(19)	3-NHCOCH=CH ₂	-OH
(20)	3-NHCOCH ₂ OCH ₃	-OH
(21)	3-NHCOCH ₂ OCH ₃	-OCH ₃
(22)	3-NHCOCH ₂ OCH ₃	-Piperidino
(23)	4-NHCOCH ₂ OCH ₃	-OH
(24)	3-NHCOOCH ₂ CH ₂ OCH ₃	-OH
(25)	3-NHCOOCH ₂ CH ₂ OCH ₃	-OCH ₃
(26)	3-NHCOOCH ₂ CH ₂ OCH ₃	-Piperidino
(27)	3-NHCONHCH ₂ CH ₂ OCH ₃	-OH
(28)	3-NHSO ₂ CH ₂ COOCH ₃	-OH
(29)	3-NHSO ₂ CH ₂ COOH	-OH
(30)	3-NHCOCH ₂ CN	-OH
(31)	3-CONHSO ₂ CH ₃	-OH
(32)	4-CONHCH ₂ CH ₂ OH	-OH
(33)	3-CONHCH ₂ COOCH ₃	-OH

【0014】

本発明化合物(I)は、I型コラーゲン遺伝子の転写を抑制する能力を有する。当該能力は、I型コラーゲン遺伝子の発現量を減少させてコラーゲン蓄積量の低下を導くことにより組織の線維化を改善するために重要である。よって、本発明化合物(I)は、I型コラーゲン遺伝子の発現量を減少させてコラーゲン蓄積量の低下を導くことにより組織の線

維化を改善するための組成物（医薬品、化粧品、食品添加物等）の有効成分として利用することができる。

本発明転写抑制組成物や本発明線維化改善組成物の適用可能な疾患としては、例えば、コラーゲンの過度の集積により組織が線維化することにより硬化し、その結果、臓器等の組織の機能低下や瘢痕形成等を来す疾患（即ち、線維症等）をあげることができる。具体的には例えば、肝硬変、間質性肺疾患、慢性腎不全（又は慢性腎不全に陥る疾患）、炎症後の過形成痕跡、術後の瘢痕や熱傷性瘢痕、強皮症、動脈硬化、高血圧等の疾患や異状等をあげることができる。因みに、肝硬変においては、1つの例として、C型又はB型肝炎ウイルスが慢性的な炎症を誘発し、 $TGF-\beta$ の量が上昇することにより、肝線維化（特に、I型・III型コラーゲンの蓄積）を引き起こして当該疾患となることがすでに知られている（例えば、*Clin. Liver Dis.*, 7, 195-210 (2003) 参照）。間質性肺疾患においては、1つの例として、ダニ・ウイルス・結核菌等による肺炎を誘発して $TGF-\beta$ の量が上昇し、肺線維化を引き起こして当該疾患となると考えられている。糖尿病性腎症やIgA腎症等の慢性腎不全においては、前者では高血糖によって腎糸球体で $TGF-\beta$ の量が上昇し、後者ではIgAが腎糸球体に蓄積することにより、腎炎を誘発して $TGF-\beta$ の量が上昇し、腎線維化（特に、I型・IV型コラーゲンの蓄積）を引き起こして当該疾患となることがすでに示唆されている（例えば、*Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, 278, F830-F838 (2000)、*Kidney Int.*, 64, 149-159 (2003) 参照）。尚、糖尿病性腎症のモデル動物であるdb/dbマウスとは、摂食を抑制するレプチン受容体に変異をもつため、過食により高血糖となり自然発症的に糖尿病を併発するものである。db/dbマウスは、正常マウスに比較して血中グルコース濃度が約4倍高く、腎糸球体線維化と $TGF-\beta$ 量との増加が認められている（例えば、*Am. J. Pathol.*, 158, 1653-1663 (2001) 参照）。またIgA腎症のモデル動物である抗Thy-1ラットとは、抗Thy-1抗体を正常ラットに投与することにより、人工的に腎線維化を引き起こさせたものである。当該モデル動物に対して抗 $TGF-\beta$ 受容体抗体を投与することにより、腎線維化が抑制されることが示されている（例えば、*Kidney Int.*, 60, 1745-1755 (2001) 参照）。強皮症においては、その原因は不明だが、そのモデル動物であるTskマウスに対し、 $TGF-\beta$ 阻害剤を投与することにより皮膚線維化の改善が認められている（例えば、*J. Invest. Dermatol.*, 118, 461-470 (2001) 参照）。以上のことから、 $TGF-\beta$ の作用を抑制する化合物は、 $TGF-\beta$ によるコラーゲン合成促進を阻害して組織の線維化を抑制し、線維症治療効果を得るための組成物（医薬品、化粧品、食品添加物等）の有効成分として利用することができるのである。

かかる本発明転写抑制組成物や本発明線維化改善組成物は、本発明化合物（I）と不活性担体とを含有する。これらの組成物中に含有される本発明化合物（I）は、通常、0.01重量%～99.99重量%であり、不活性担体は、通常、99.99重量%～0.01重量%である。該不活性担体は、薬学的に許容される担体や賦形剤であり、本発明転写抑制組成物や本発明線維化改善組成物はさらに、医薬品添加剤、化粧品添加剤、食品添加剤等を含有してもよい。

【0015】

また、本発明化合物（I）は、後述する実施例18にも示されるように、 $TGF-\beta$ が有するI型コラーゲン遺伝子の転写促進能力を阻害する。即ち、本発明化合物（I）は $TGF-\beta$ の作用を抑制する能力を有する $TGF-\beta$ アンタゴニストである。よって、本発明化合物（I）は、 $TGF-\beta$ 作用抑制組成物の有効成分として利用することもできる。 $TGF-\beta$ は、毛髪の成長サイクルにおける成長期（以下、毛髪成長期と記すこともある。）から退行期（以下、毛髪退行期と記すこともある。）への移行を促進する能力を有することが知られている[*J. Invest. Dermatol.*, 111, 948-954 (1998)、*FASEB J.*, 16, 1967-1969 (2002)]。さらに、抗 $TGF-\beta$ 抗体や、 $TGF-\beta$ 阻害剤であるFetuin等は、 $TGF-\beta$ による毛

の伸長抑制作用に対して拮抗的に働き、毛の伸長促進作用を示すことが報告されている [J. Invest. Dermatol., 118, 993-997 (2002)、公開特許公報 特開 2000-342296]。よって、本発明化合物 (I) (及びこれを有効成分として含有する TGF- β 作用抑制組成物) は、TGF- β による毛髪退行期への移行促進を阻害して毛髪成長期の延長を導くことにより養毛効果を得るために利用してもよい。

かかる本発明 TGF- β 抑制組成物や本発明養毛組成物は、本発明化合物 (I) と不活性担体とを含有する。これらの組成物中に含有される本発明化合物 (I) は、通常、0.01 重量%~99.99 重量%であり、不活性担体は、通常、99.99 重量%~0.01 重量%である。当該不活性担体は、薬学的に許容される担体や賦形剤であり、本発明 TGF- β 抑制組成物や本発明養毛組成物はさらに、医薬品添加剤、化粧品添加剤、食品添加剤等を含有してもよい。

【0016】

上記組成物に用いられる薬学的に許容される担体、賦形剤、医薬品添加剤、食品添加剤、化粧品添加剤等は、当該組成物の具体的用途に応じて適宜選択することができる。また、当該組成物の形態も、具体的用途に応じて、例えば、種々の固体、液体等の形態とすることができる。

例えば、本発明化合物 (I) を医薬品の有効成分として用いる場合には、具体的な形態として、例えば、散剤、細粒剤、顆粒剤、錠剤、シロップ剤、カプセル剤、懸濁化剤、エマルジョン剤、エキス剤及び丸剤等の経口剤、注射剤、外用液剤や軟膏剤等の経皮吸収剤、坐剤及び局所剤等の非経口剤等をあげることができる。

経口剤は、例えば、ゼラチン、アルギン酸ナトリウム、澱粉、コーンスターチ、白糖、乳糖、ぶどう糖、マンニト、カルボキシメチルセルロース、デキストリン、ポリビニルピロリドン、結晶セルロース、大豆レシチン、ショ糖、脂肪酸エステル、タルク、ステアリン酸マグネシウム、ポリエチレングリコール、ケイ酸マグネシウム、無水ケイ酸等の担体や賦形剤、結合剤、崩壊剤、界面活性剤、滑沢剤、流動性促進剤、希釈剤、保存剤、着色剤、香料、安定化剤、保湿剤、防腐剤、酸化防止剤等の医薬品添加剤を用いて、通常の方法に従って製造することができる。

投与量は、投与される哺乳動物の年令、性別、体重、疾患の程度、本発明の組成物の種類、投与形態等によって異なるが、通常は経口の場合にはヒト成人で1日あたり有効成分量として約1mg~約2g、好ましくは有効成分量として約5mg~約1gを投与すればよい。また、前記の1日の投与量を1回又は数回に分けて投与することができる。

非経口剤のうち、注射剤は、生理食塩水、滅菌水リンゲル液等の水溶性溶剤、植物油、脂肪酸エステル等の非水溶性溶剤、ブドウ糖、塩化ナトリウム等の等張化剤、溶解補助剤、安定化剤、防腐剤、懸濁化剤、乳化剤等の医薬品添加剤を用いて、通常の方法に従って製造することができる。外用液剤、ゲル状軟膏等の経皮吸収剤、直腸内投与のための坐剤等も通常の方法に従って製造することができる。このような非経口剤を投与するには、注射(皮下、静脈内等)、経皮投与、直腸投与すればよい。局所剤は、例えば、本発明化合物 (I) をエチレンビニル酢酸ポリマー等の徐放性ポリマーのペレットに取り込ませて製造することができる。このペレットを治療すべき組織中に外科的に移植すればよい。

投与量は、投与される哺乳動物の年令、性別、体重、疾患の程度、本発明の組成物の種類、投与形態等によって異なるが、通常は注射の場合にはヒト成人で有効成分量として約0.1mg~約500mgを投与すればよい。また、前記の1日の投与量を1回又は数回に分けて投与することができる。

本発明化合物 (I) を化粧品に添加して用いる場合には、当該化合物が添加された化粧品の具体的な形態としては、例えば、液状、乳状、クリーム、ローション、軟膏、ゲル、エアゾール、ムース等をあげることができる。ローションは、例えば、懸濁剤、乳化剤、保存剤等の化粧品添加剤を用いて、通常の方法に従って製造することができる。

投与量は、投与される哺乳動物の年令、性別、体重、疾患の程度、本発明の組成物の種類、投与形態等によって異なるが、通常ヒト成人で有効成分量として約0.01mg~約

50mgを投与すればよい。また、前記の1日の投与量を1回又は数回に分けて投与することができる。

本発明化合物(I)を食品添加物として用いる場合には、当該添加物が添加された食品の具体的な形態としては、例えば、粉末、錠剤、飲料、摂取可能なゲル若しくはシロップとの混合液状物、例えば、調味料、和菓子、洋菓子、氷菓、飲料、スプレッド、ペースト、漬物、ビン缶詰、畜肉加工品、魚肉・水産加工品、乳・卵加工品、野菜加工品、果実加工品、穀類加工品等の一般的な飲食物や嗜好物等をあげることができる。また、家畜、家禽、蜜蜂、蚕、魚等の飼育動物のための飼料や餌料への添加も可能である。

投与量は、投与される哺乳動物の年令、性別、体重、疾患の程度、本発明の組成物の種類、投与形態等によって異なるが、通常ヒト成人で有効成分量として約0.1mg~約500mgを投与すればよい。また、前記の1日の投与量を1回又は数回に分けて投与することができる。

【実施例】

【0017】

以下に実施例を挙げ、本発明を更に具体的に説明する。

【0018】

実施例1 ベンズアルデヒド誘導体(X)及び(X') [化合物番号(a)]の合成

3-アミノベンジルアルコール12.31g、テトラヒドロフラン160ml及びトリエチルアミン12.41gの混合物に、メトキシアセチルクロリド11.42gのテトラヒドロフラン40ml溶液を10℃で添加した。室温で1時間20分間攪拌した後、不溶物を濾別し、濾液を減圧濃縮して、得られた残渣を酢酸エチル200mlに溶解した。有機層を水、希塩酸、飽和食塩水の順で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥した後、濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに供することにより、油状の3-(メトキシアセチルアミノ)ベンジルアルコール15.88gを得た。

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3) δ (ppm): 1.83 (t, 1H, J=5.1Hz), 3.50 (s, 3H), 4.01 (s, 2H), 4.69 (d, 2H, J=4.4Hz), 7.13 (dd, 1H, J=0.5, 7.1Hz), 7.33 (t, 1H, J=7.8Hz), 7.50 (dd, 1H, J=1.0, 8.1Hz), 7.59 (s, 1H), 8.26 (broad s, 1H)

オキザリルクロリド11.40g及びジクロロメタン200mlの混合物に、ジメチルスルホキシド14mlのジクロロメタン30ml溶液を-60℃で15分間で滴下した。-60℃で10分間攪拌した後、3-(メトキシアセチルアミノ)ベンジルアルコール15.88gのジクロロメタン70ml溶液を-60℃で20分間で滴下した。-60℃で10分間攪拌した後、トリエチルアミン24.82gを-60℃で20分間で滴下した。室温で45分間攪拌した後、反応液に水500mlを加え、酢酸エチル300mlで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥した後濃縮することにより、3-(メトキシアセチルアミノ)ベンズアルデヒド [化合物番号(a)] の白色結晶14.93gを得た。

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3) δ (ppm): 3.53 (s, 3H), 4.05 (s, 2H), 7.52 (t, 1H, J=7.8Hz), 7.65 (d, 1H, J=7.6Hz), 7.93 (d, 1H, J=8.0Hz), 8.06 (s, 1H), 8.41 (broad s, 1H), 10.01 (s, 1H)

【0019】

実施例2 ベンズアルデヒド誘導体(X)及び(X') [化合物番号(b)]の合成

3-アミノベンジルアルコールの代わりに、4-アミノベンジルアルコール25.41gを用いた以外は実施例1と同様にして、4-(メトキシアセチルアミノ)ベンジルアルコールの淡黄色固体37.96gを得た。

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3) δ (ppm): 2.35 (broad s, 1H), 3.51 (s, 3H), 4.00 (s, 2H), 4.62 (s, 2H), 7.30 (d, 2H, J=8.0Hz), 7.53 (d, 2H, J=8.6Hz), 8.28 (b

oad s, 1H)

また、3-(メトキシアセチルアミノ)ベンジルアルコールの代わりに、4-(メトキシアセチルアミノ)ベンジルアルコール37.96gを用いた以外は実施例1と同様にして、4-(メトキシアセチルアミノ)ベンズアルデヒド [化合物番号 (b)] の黄色固体30.78gを得た。

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3) δ (ppm): 3.53 (s, 3H), 4.05 (s, 2H), 7.77 (d, 2H, $J=8.6\text{ Hz}$), 7.87 (d, 2H, $J=8.3\text{ Hz}$), 8.48 (broad s, 1H), 9.94 (s, 1H)

【0020】

実施例3 ベンズアルデヒド誘導体(X)及び(X') [化合物番号 (c)] の合成

テトラヒドロフラン200ml, ピリジン26.00g及びグリシン メチルエステル塩酸塩20.70gの混合物に、3-ホルミル安息香酸クロリド16.00gのテトラヒドロフラン20ml溶液を10℃で添加した。室温で6時間攪拌した後、不溶物を濾別し、濾液を減圧濃縮し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに供することにより、油状の3-[[(メトキシカルボニルメチル) アミノ] カルボニル] ベンズアルデヒド [化合物番号 (c)] 4.23gを得た。

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3) δ (ppm): 3.83 (s, 3H), 4.29 (d, 2H, $J=4.9\text{ Hz}$), 6.78 (broad s, 1H), 7.65 (t, 1H, $J=7.6\text{ Hz}$), 8.04 (d, 1H, $J=7.6\text{ Hz}$), 8.11 (d, 1H, $J=7.6\text{ Hz}$), 8.31 (s, 1H), 10.08 (s, 1H)

【0021】

実施例4 ベンズアルデヒド誘導体(X)及び(X') [化合物番号 (d)] の合成

3-ホルミル安息香酸クロリドの代わりに、4-ホルミル安息香酸クロリド15.40gを用いた以外は実施例3と同様にして、4-[[(メトキシカルボニルメチル) アミノ] カルボニル] ベンズアルデヒド [化合物番号 (d)] の淡黄色固体5.79gを得た。

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3) δ (ppm): 3.83 (s, 3H), 4.29 (s, 2H), 6.73 (broad s, 1H), 7.97 (s, 4H), 10.09 (s, 1H)

【0022】

実施例5 ベンズアルデヒド誘導体(X)及び(X') [化合物番号 (e)] の合成

テトラヒドロフラン200ml, トリエチルアミン16.70g及び2-メトキシエチルアミン12.40gの混合物に、3-ホルミル安息香酸クロリド16.00gのテトラヒドロフラン20ml溶液を室温で添加した。室温で6時間攪拌した後、不溶物を濾別し、濾液を減圧濃縮し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに供することにより、油状の3-[(2-メトキシエチル) アミノカルボニル] ベンズアルデヒド [化合物番号 (e)] 10.79gを得た。

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3) δ (ppm): 3.41 (s, 3H), 3.59 (t, 2H, $J=4.6\text{ Hz}$), 3.69 (dt, 2H, $J=5.3, 5.4\text{ Hz}$), 7.64 (t, 1H, $J=7.6\text{ Hz}$), 8.03 (dt, 1H, $J=1.2, 7.6\text{ Hz}$), 8.10 (dt, 1H, $J=1.2, 7.8\text{ Hz}$), 8.27 (s, 1H), 10.08 (s, 1H)

【0023】

実施例6 製造法Aによる本発明化合物 (I) [化合物番号 (13)] の合成

クロロホルム5mlに3-アセチル-4-ヒドロキシ-2H-1-ベンゾピラン-2-オン0.57g、3-(シアノメトキシ)ベンズアルデヒド0.45g及びピペリジン0.20gを溶解し、モレキュラーシーブスを充填したソックスレー抽出器で水分を除去しつつ、還流下に1時間30分間加熱した。室温に冷却後、反応液を10%塩酸、飽和食塩水で順次洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥した後、濃縮した。析出した結晶をジオキサン10ml及びクロロホルム10mlの混合物で洗い、続いてト-ブチルメチルエーテル10mlで洗うことにより、4-ヒドロキシ-3-[3-[3-(シアノメトキシ)フェニル]-1-オキソ-2-プロペニル

] - 2H-1-ベンゾピラン-2-オン [化合物番号 (13)] の黄色結晶 0.56 g を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 4.83 (s, 2H), 7.08 (d, 1H, $J=8.0\text{ Hz}$), 7.20~7.40 (5H), 7.70 (t, 1H, $J=7.1\text{ Hz}$), 8.01 (d, 1H, $J=15.9\text{ Hz}$), 8.11 (d, 1H, $J=8.1\text{ Hz}$), 8.44 (d, 1H, $J=15.6\text{ Hz}$)

【0024】

実施例 7 製造法 B による本発明化合物 (I) [化合物番号 (14)] の合成

ヘキサメチルホスホラミド 5 ml 及び 4-ヒドロキシ-3-[3-[3-(シアノメトキシ)フェニル]-1-オキシ-2-プロペニル]-2H-1-ベンゾピラン-2-オン 0.40 g の混合物に、水素化ナトリウム (60%油性) 52 mg を加え、室温で 1 時間攪拌した。次いで、ジメチル硫酸 0.17 g を加えて、室温で一夜攪拌した。その後、反応混合物を氷水に注加し、酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥した後、濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに供することにより、4-メトキシ-3-[3-[3-(シアノメトキシ)フェニル]-1-オキシ-2-プロペニル]-2H-1-ベンゾピラン-2-オン [化合物番号 (14)] の淡黄色結晶 81 mg を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 4.04 (s, 3H), 4.80 (s, 2H), 7.04 (d, 1H, $J=5.6\text{ Hz}$), 7.16 (d, 1H, $J=16.1\text{ Hz}$), 7.10~7.40 (5H), 7.58 (d, 1H, $J=16.2\text{ Hz}$), 7.60 (t, 1H), 7.93 (d, 1H, $J=8.1\text{ Hz}$)

【0025】

実施例 8 製造法 A による本発明化合物 (I) [化合物番号 (20)] の合成

クロロホルム 3 ml に 3-アセチル-4-ヒドロキシ-2H-1-ベンゾピラン-2-オン 0.18 g、3-(メトキシアセチルアミノ)ベンズアルデヒド 0.17 g 及び ピペリジン 60 mg を溶解し、モレキュラーシーブスを充填したソックスレー抽出器で水分を除去しつつ、還流下に 1 時間 10 分間加熱した。室温に冷却後、反応液を減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、薄層クロマトグラフィー (シリカゲル、クロロホルム (2% メタノール含有)) で $R_f=0.3$ に相当する区画を集めて濃縮することにより、4-ヒドロキシ-3-[3-[3-(メトキシアセチルアミノ)フェニル]-1-オキシ-2-プロペニル]-2H-1-ベンゾピラン-2-オン [化合物番号 (20)] 0.30 g を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 3.54 (s, 3H), 4.05 (s, 2H), 7.20~7.31 (2H), 7.33 (t, 1H, $J=7.1\text{ Hz}$), 7.49 (d, 1H, $J=7.8\text{ Hz}$), 7.70 (dt, 1H, $J=1.7, 7.3\text{ Hz}$), 7.76 (s, 1H), 7.86 (d, 1H, $J=7.1\text{ Hz}$), 8.03 (d, 1H, $J=16.1\text{ Hz}$), 8.10 (dd, 1H, $J=1.7, 8.1\text{ Hz}$), 8.35 (s, 1H), 8.43 (d, 1H, $J=15.9\text{ Hz}$), 11.21 (s, 1H)

【0026】

実施例 9 製造法 B による本発明化合物 (I) [化合物番号 (21)] の合成

テトラヒドロフラン 5 ml 及び ジクロロメタン 6 ml の混合物に 4-ヒドロキシ-3-[3-[3-(メトキシアセチルアミノ)フェニル]-1-オキシ-2-プロペニル]-2H-1-ベンゾピラン-2-オン 0.59 g、トリフェニルホスフィン 0.45 g 及び メタノール 55 mg を加え、この混合物にアゾジカルボン酸ジエチルの 40% トルエン溶液 0.74 g を滴下した。室温で 40 分間攪拌し、反応液を減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに供することにより、4-メトキシ-3-[3-[3-(メトキシアセチルアミノ)フェニル]-1-オキシ-2-プロペニル]-2H-1-ベンゾピラン-2-オン [化合物番号 (21)] 0.18 g を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 3.51 (s, 3H), 4.02 (s, 3H), 4.04 (s, 2H), 7.16 (d, 1H, $J=16.2\text{ Hz}$), 7.29~7.39 (4H), 7.59 (d, 1H, $J=16.4\text{ Hz}$), 7.61 (dt, 1H, $J=1.5, 8.8\text{ Hz}$), 7.87 (s, 1H), 7.92 (dd, 1H, J

=1.5, 8.1 Hz), 8.30 (s, 1H)

【0027】

実施例10 製造法Cによる本発明化合物(I) [化合物番号(22)]の合成

実施例8のシリカゲルカラムクロマトグラフィーにて、薄層クロマトグラフィー(シリカゲル、クロロホルム(2%メタノール含有))でRf=0.1に相当する区画を集めて濃縮することにより、4-ピペリジノ-3-[3-[3-(メトキシアセチルアミノ)フェニル]-1-オキソ-2-プロペニル]-2H-1-ベンゾピラン-2-オン [化合物番号(22)] 36.1mgを得た。

¹H-NMR (400MHz, CDCl₃) δ (ppm): 1.75~2.05 (6H), 3.50 (s, 3H), 3.85~3.95 (4H), 4.01 (s, 2H), 7.08 (d, 1H, J=15.7Hz), 7.20~7.30 (3H), 7.33 (t, 1H, J=8.1Hz), 7.42 (d, 1H, J=15.9Hz), 7.51 (t, 1H, J=7.3Hz), 7.57 (d, 1H), 7.82 (s, 1H), 8.07 (dd, 1H, J=1.5, 7.8Hz), 8.27 (s, 1H)

【0028】

実施例11 製造法Aによる本発明化合物(I) [化合物番号(24)]の合成

クロロホルム10mlに3-アセチル-4-ヒドロキシ-2H-1-ベンゾピラン-2-オン2.04g、3-[(2-メトキシエトキシ)カルボニルアミノ]ベンズアルデヒド2.23g及びピペリジン60mgを溶解し、モレキュラーシーブスを充填したソックスレー抽出器で水分を除去しつつ、還流下に1時間30分間加熱した。室温に冷却した後、反応液を減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、薄層クロマトグラフィー(シリカゲル、ヘキサン/アセトン(1:1))でRf=0.3に相当する区画を集めて濃縮することにより、4-ヒドロキシ-3-[3-[3-[(2-メトキシエトキシ)カルボニルアミノ]フェニル]-1-オキソ-2-プロペニル]-2H-1-ベンゾピラン-2-オン [化合物番号(24)] 3.42gを得た。

¹H-NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 3.30 (s, 3H), 3.59 (t, 2H, J=3.2Hz), 4.23 (t, 2H, J=4.6Hz), 7.35~7.50 (5H), 7.60 (d, 1H, J=7.6Hz), 7.82 (t, 1H, J=7.1Hz), 7.94 (s, 1H), 7.97 (d, 1H, J=15.9Hz), 8.06 (d, 1H, J=8.1Hz), 8.27 (d, 1H, J=15.9Hz), 9.97 (s, 1H)

【0029】

実施例12 製造法Bによる本発明化合物(I) [化合物番号(25)]の合成

4-ヒドロキシ-3-[3-[3-(シアノメトキシ)フェニル]-1-オキソ-2-プロペニル]-2H-1-ベンゾピラン-2-オンの代わりに、4-ヒドロキシ-3-[3-[3-[(2-メトキシエトキシ)カルボニルアミノ]フェニル]-1-オキソ-2-プロペニル]-2H-1-ベンゾピラン-2-オン2.0gを用いた以外は実施例7と同様にして、4-メトキシ-3-[3-[3-[(2-メトキシエトキシ)カルボニルアミノ]フェニル]-1-オキソ-2-プロペニル]-2H-1-ベンゾピラン-2-オン [化合物番号(25)] 1.28gを得た。

¹H-NMR (400MHz, CDCl₃) δ (ppm): 3.43 (s, 3H), 3.65 (t, 2H, J=4.2Hz), 4.03 (s, 3H), 4.34 (t, 2H, J=4.4Hz), 6.73 (s, 1H), 7.14 (d, 1H, J=16.4Hz), 7.25~7.50 (5H), 7.56 (d, 1H, J=16.4Hz), 7.59 (t, 1H), 7.70 (s, 1H), 7.91 (dd, 1H, J=8.8Hz)

【0030】

実施例13 製造法Cによる本発明化合物(I) [化合物番号(26)]の合成

実施例11のシリカゲルカラムクロマトグラフィーにて、薄層クロマトグラフィー(シリカゲル、クロロホルム(2%メタノール含有))でRf=0.1に相当する区画を集めて濃縮することにより、4-ピペリジノ-3-[3-[3-[(2-メトキシエトキシ)カルボニルアミノ]フェニル]-1-オキソ-2-プロペニル]-2H-1-ベンゾピラン-2-オン [化合物番号(26)]

] 0.15 gを得た。

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 1.70~1.95 (6H), 3.31 (s, 3H), 3.55 (t, 2H, $J=4.6$ Hz), 3.79 (s, 2H), 3.95~4.20 (4H), 4.19 (t, 2H, $J=4.4$ Hz), 7.21 (d, 1H, $J=8.3$ Hz), 7.28~7.58 (5H), 7.69 (s, 1H), 7.85 (dd, 1H, $J=1.7, 8.1$ Hz), 9.79 (s, 1H)

【0031】

実施例14 製造法Aによる本発明化合物(I) [化合物番号(32)] の合成

3-(シアノメトキシ)ベンズアルデヒドの代わりに、4-[(2-ヒドロキシエチル)アミノカルボニル]ベンズアルデヒド0.56 gを用いた以外は実施例6と同様にして、4-ヒドロキシ-3-[3-[4-[(2-ヒドロキシエチル)アミノカルボニル]フェニル]-1-オキソ-2-プロペニル]-6-メチル-2H-ピラン-2-オン [化合物番号(32)] 58 mgを得た。

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 3.35 (t, 2H, $J=5.6$ Hz), 3.52 (t, 2H, $J=6.1$ Hz), 7.40~7.55 (2H), 7.80~7.90 (3H), 7.90~8.00 (2H), 8.80~8.10 (2H), 8.32 (d, 1H, $J=15.9$ Hz), 8.56 (t, 1H, $J=5.4$ Hz)

【0032】

実施例15 製造法Aによる本発明化合物(I) [化合物番号(33)] の合成

3-(シアノメトキシ)ベンズアルデヒドの代わりに、3-[[[(メトキシカルボニルメチル)アミノ]カルボニル]ベンズアルデヒド1.58 gを用いた以外は実施例6と同様にして、4-ヒドロキシ-3-[3-[3-[[[(メトキシカルボニルメチル)アミノ]カルボニル]フェニル]-1-オキソ-2-プロペニル]-6-メチル-2H-ピラン-2-オン [化合物番号(33)] の黄色結晶0.65 gを得た。

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 3.67 (s, 3H), 4.05 (d, 2H, $J=6.0$ Hz), 7.40~7.48 (2H), 7.58~7.68 (1H), 7.83 (t, 1H, $J=7.6$ Hz), 7.90~8.00 (2H), 8.00~8.10 (2H), 8.25 (s, 1H), 8.33 (d, 1H, $J=15.6$ Hz), 9.15 (t, 1H, $J=6.0$ Hz)

【0033】

実施例16 製造法Aによる本発明化合物(I) [化合物番号(37)] の合成

3-(シアノメトキシ)ベンズアルデヒドの代わりに、4-[(2-メトキシエチル)アミノカルボニル]ベンズアルデヒド1.60 gを用いた以外は実施例6と同様にして、4-ヒドロキシ-3-[3-[4-[(2-メトキシエチル)アミノカルボニル]フェニル]-1-オキソ-2-プロペニル]-6-メチル-2H-ピラン-2-オン [化合物番号(37)] の黄色結晶0.68 gを得た。

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl $_3$) δ (ppm): 3.41 (s, 3H), 3.59 (t, 2H, $J=5.2$ Hz), 3.69 (t, 2H, $J=5.2$ Hz), 6.55 (s, 1H), 7.30~7.40 (2H), 7.65~7.75 (1H), 7.78 (d, 2H, $J=8.4$ Hz), 7.84 (d, 2H, $J=8.4$ Hz), 8.04 (d, 1H, $J=16.0$ Hz), 8.10 (d, 1H, $J=8.0$ Hz), 8.50 (d, 1H, $J=15.6$ Hz), 11.29 (s, 1H)

【0034】

実施例17 (I型コラーゲン遺伝子の転写調節領域と結合されたレポーター遺伝子とを有するプラスミドの調製)

正常ヒト胎児皮膚線維芽細胞 (Clontech社、カタログ番号CC-2509) 1×10^8 細胞を37℃、5% CO $_2$ 雰囲気下で一晩培養した。培養された細胞をPBSで2回洗浄した後、PBS 3 mlを加えセルスクレイパー (Nalgen、カタログ番号179693) を用いて細胞を器壁から剥がした。剥がされた細胞を遠心分離 (1,500 rpm、4℃、15分間) により集め、これをPBS 20 mlに懸濁して再度遠心分離した。得られた沈殿に、DNA Extraction Kit (Stratagene社、カタログ番号200600) のSolution 2を11 ml、pronaseを4

・ 8 μ l それぞれ加えて 60℃ にて 1 時間振とうした後、得られた混合液を氷中に 10 分間放置した。次に、当該混合液に上記キットの Solution 3 を 4 ml 加えて混合した後、これを氷中に 5 分間放置した。遠心分離 (3,000 rpm、4℃、15 分間) し、上清を回収した。回収された上清に、当該上清 1 ml 当たり 2 μ l の RNase を加え、37℃ で 15 分間放置した。この混合液に、2 倍容量のエタノールを加えて混合し、出現した白い糸状の物質 (ゲノム DNA) を回収した。回収されたゲノム DNA を 70% エタノールで洗浄した後、風乾した。風乾されたゲノム DNA を 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA (pH 8.0) (以下、TE と記す。) 500 μ l に溶解した。

得られたゲノム DNA 溶解液 (ゲノム DNA 1 μ g 相当量) と、配列番号 1 で示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチド及び配列番号 2 で示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチド (10 pmol/ μ l) 各 1 μ l、蒸留水 29 μ l、TaKaRa LA Taq (宝酒造社、カタログ番号 RR002A) に添付された buffer 5 μ l、Mg²⁺ 溶液 5 μ l、dNTP mixture 5 μ l 及び TaKaRa LA Taq (宝酒造社、カタログ番号 RR002A) 0.5 μ l を混合した。得られた混合液を 94℃、5 分間保温した後、94℃、1 分間次いで 60℃、1 分間さらに 72℃、1 分間の保温を 1 サイクルとしてこれを 30 サイクル行った。当該混合液を 2% アガロースゲル電気泳動に供することにより、約 0.5 kb の DNA を回収した。回収された DNA をフェノール・クロロホルム処理した後、エタノール沈殿することにより DNA を回収した。回収された DNA を超純水に溶解し、この溶解液に NheI 2.5 μ l 及び HindIII 2.5 μ l を加え、37℃ で 3 時間保温した。次いで、当該溶解液を 2% アガロースゲル電気泳動に供することにより、約 3.5 kb の DNA を回収した。回収された DNA をエタノール沈殿することにより再び DNA (以下、コラーゲンプロモーター DNA と記す。) を回収した。

一方、ホタルルシフェラーゼをコードする塩基配列を有するベクター pGL3 (Promega 社、カタログ番号 E1751) を NheI 及び HindIII で消化した後、上記と同様にアガロースゲル電気泳動に供することにより、約 5 kb の DNA を回収した。回収された DNA をエタノール沈殿することにより再び DNA を回収した。回収された DNA に蒸留水 44 μ l、Alkaline Phosphatase (宝酒造、カタログ番号 2120A) に添付された Buffer 5 μ l 及び Alkaline Phosphatase (宝酒造社、カタログ番号 2120A) 1 μ l を加えて、この混合液を 65℃ で 30 分間保温した。次に、当該混合液を 2 回フェノール・クロロホルム処理した後、エタノール沈殿することにより DNA (以下、Luc ベクター DNA と記す。) を回収した。次いで、上記コラーゲンプロモーター DNA 約 20 ng と Luc ベクター DNA 約 20 ng とを混合した後、DNA Ligation kit Ver 2 酵素溶液を同量添加して 16℃ で一昼夜保温した。当該混合液に大腸菌 5Hd α (TOYOBO 社、カタログ番号 DNA-903) を加えて氷中に 30 分間放置し、次いで 42℃、45 秒間保温した後、得られた大腸菌を 50 μ g/ml アンピシリンナトリウム (ナカライ社、カタログ番号 027-39) を含む LB プレートに播種し、37℃、一昼夜放置した。出現したシングルコロニーを 50 μ g/ml アンピシリンを含む LB 培地 2 ml で 37℃、12 時間培養した。得られた培養液から AUTOMATIC DNA ISOLATION SYSTEM PI-50 (KURABO 社) を用いてプラスミド DNA を調製した。調製されたプラスミド DNA の塩基配列を DNA シークエンサーで分析した。その結果、当該プラスミド (以下、COL-Luc と記す。) は、ヒト由来の I 型コラーゲン α 2 鎖遺伝子の転写調節領域の -3500 ~ +57 (転写開始点を +1 とする。) の塩基配列の下流に、レポーター遺伝子としてホタルルシフェラーゼのアミノ酸配列をコードする塩基配列が接続されてなる塩基配列を保有していることが確認された。

【0035】

実施例 18 (レポーター遺伝子の発現量を指標とした被験化合物が有する I 型コラーゲン遺伝子の転写調節能力の測定)

正常ヒト胎児皮膚線維芽細胞 1 x 10⁶ 細胞を 100 mm ディッシュに播種し、非働化

牛胎児血清（以下、FBSと記す。Gibco社、カタログ番号21140-079）を10（v/v）%含むDulbecco's-MEM（日水製薬社、カタログ番号05919）培地（以下、当該培地をD-MEM（+）と記す。）中で37℃、5%CO₂雰囲気下において一晚培養した。次いで培地を、FBSを含まないDulbecco's-MEM培地（以下、当該培地をD-MEM（-）と記す。）に置換した。

D-MEM（-）300μlに、COL-Luc 5μg及びpCMV-β-gal（Invitrogen社、カタログ番号10586-014）5μgを加え、得られた混合液を室温で5分間放置した（溶液1）。また、D-MEM（-）300μlにLipofectine（Gibco社、カタログ番号18292-011）20μlを加え、得られた混合液を室温で45分間放置した（溶液2）。次に、溶液1と溶液2とを混合し、これを室温で10分間放置した後、当該混合液にD-MEM（-）5.4mlを加えて混合した。当該混合液を前記正常ヒト胎児皮膚線維芽細胞に添加した後、当該細胞を37℃、5%CO₂雰囲気下で培養した。6時間後、ディッシュから培養上清を除き、細胞をPBSで2回洗浄した後、ディッシュに0.25%トリプシンを含むPBS 1mlを添加してディッシュから細胞を剥がした。剥がされた細胞にD-MEM（+）を加えてよく混合した後、当該混合物を12ウエルプレートに1mlずつ分注し、これを37℃、5%CO₂雰囲気下で終夜培養した。翌日、各ウエルをD-MEM（-）で2回洗浄した後、0.1% FBSを含むDulbecco's-MEM培地（以下、当該培地をD-MEM（0.1%）と記す。）1mlに置換した。

このようにして培養された細胞に、化合物番号（13）、（14）、（20）～（22）、（24）～（26）、（32）、（33）又は（37）で示される本発明化合物（I）をそれぞれ100μMとなるようジメチルスルホキシド（以下、DMSOと記す。）に溶解させてなる溶液10μlを添加した（最終濃度1μM）。尚、対照ではDMSO 10μlのみを添加した。

1時間後、TGF-β（Peprro Tech社）の0.5μg/ml水溶液又は蒸留水を10μl添加し、37℃、5%CO₂雰囲気下でさらに40時間培養した。培養された細胞をPBSで2回洗浄した後、これに細胞溶解剤（東洋インキ社、カタログ番号PD10）200μlを加え細胞を剥がした。剥がされた細胞を細胞懸濁液として回収した後、これを遠心分離（15,000rpm、4℃、5分間）することにより、上清を回収した。回収された上清各50μlを96ウエルプレートに移した後、MICROLUMAT LB96P（EG&G BERTHOLD社製）を用いて、Lucアッセイ溶液（20mM Tricine（pH7.8）、2.67mM MgSO₄、0.1mM EDTA、33.3mM DTT、270μM Coenzyme A、530μMATP、470μM Luciferin）50μlを当該プレートに自動分注した後、各ウエル内の発光量を測定した（Delay:1.6秒、Meas.Interval:20秒）。

一方、回収された上清又は細胞溶解剤50μlを、予め96ウエルプレートに分注されたβ-gal基質溶液（5.8mM o-nitrophenyl-beta-D-galactopyranoside、1mM MgCl₂、45mM 2-メルカプトエタノール）50μlに加えて37℃、2時間インキュベートした後、マイクロプレートリーダーを用いて各ウエル内の420nmの吸光度を測定した。得られた値を基にし、次式に従って転写活性を算出した。

転写活性 = [発光量（上清添加区） - 発光量（細胞溶解剤添加区）] / [420nm吸光度（上清添加区） - 420nm吸光度（細胞溶解剤添加区）]

次に、算出された転写活性を基にし、次式に従って、TGF-βが有するI型コラーゲン遺伝子の転写促進能力に対する被験化合物の阻害効果を阻害度として算出した。

阻害度 = [転写活性（DMSO及びTGF-β添加試験区） - 転写活性（化合物及びTGF-β添加試験区）] / [転写活性（DMSO及びTGF-β添加試験区） - 転写活性（DMSO及びTGF-β無添加試験区）] × 100

化合物番号（13）、（14）、（20）～（22）、（24）～（26）、（32）、（33）又は（37）で示される本発明化合物（I）の阻害度は、いずれも70以上で

あった。これらの化合物が、 $TGF-\beta$ が有するI型コラーゲン遺伝子の転写促進能力を阻害し、I型コラーゲン遺伝子の転写を抑制する能力を有することが確認された。

【0036】

実施例19 (本発明化合物(I)の投与による慢性腎不全の改善)

(1) 抗Thy-1抗体(IgG)の調製

MAbTrap Kit (Amersham Biosciences社、カタログ番号17-1128-01)を用い、抗ラットCD90(Thy1.1)モノクローナル抗体を含む腹水凍結乾燥粉末(CEDARLANE社、ロット番号05122)からIgGを精製した。

腹水3ml分にbinding buffer 6mlを加えて十分に回収し、0.22 μ mのフィルターを通した。得られた溶液を予めバッファライズしたカラムにアプライした後、10ml binding bufferで洗浄した。その後、5ml elution bufferで溶出した。洗浄時から1mlごとに分画し、牛血清アルブミンを標準として各画分のタンパク濃度を測定した。溶出パターンから単一ピークを確認し、IgG画分を生理食塩水に対して4℃、終夜で透析した。得られた抗Thy-1抗体(IgG)のタンパク濃度を算出した。

(2) 抗Thy-1抗体(IgG)及び化合物の投与

化合物番号(20)で示される本発明化合物(I)(以下、本発明化合物(20)と記す。)及び媒体であるコーンオイルをそれぞれ秤量し、これらを乳鉢及び乳棒を用いて混合して3mg/kg溶液を作製した。7週齢の雄のWistarラット[日本チャールス・リバー(株)]を1群当り4匹用い、60 μ g/ml抗Thy-1抗体(IgG)又は生理食塩水を5ml/kgの割合で尾静脈より静注した。投与直後から本発明化合物又はコーンオイルを5ml/kgの割合で7日間反復経口投与した。本発明化合物の投与量は15mg/kg/dayであった。

(3) 腎糸球体のI型コラーゲン遺伝子のmRNAの定量

最終投与翌日に全採血により、上記(2)のようにして飼育されたラットを屠殺し、腎臓を摘出した。摘出された腎臓の腎臓皮質からRNeasy Mini Kit(QIAGEN社、カタログ番号74106)を用いて全RNAを分離した。分離された全RNA 5 μ l(50ng)に、20 μ M オリゴdT 1 μ l及びRNaseフリー蒸留水 4 μ lを加えて65℃、5分間インキュベートした直後に氷冷した。当該溶液10 μ lに、5 \times バッファー 4 μ l、MgCl₂ 2.4 μ l、10mM dNTP 1 μ l、RNasin 1 μ l、ImpromII 1 μ l、RNaseフリー蒸留水0.6 μ l(以上全てPromega社)を加えて25℃ 5分間、42℃ 1時間、70℃ 15分間の条件で逆転写反応した。

逆転写反応溶液5 μ lに、配列番号3、4で示される各1.25pmol/ μ lのプライマー2 μ l、配列番号5で示されるI型コラーゲン遺伝子のDNA検出用プローブ(FA M-ctgccttca tgcgcctgct agc-TAMRA) 1.25 μ l、Rodent GAPDHプライマー 各0.25 μ l、Rodent GAPDHプローブ 0.25 μ l、TaqMan Universal PCR Master Mix(以上全てアプライドバイオシステム社) 12.5 μ l及び滅菌水 1.5 μ lをOptical 96-Well Reaction Plate(アプライドバイオシステム社、カタログ番号N801-0560)のウエル中で混合した。スタンダードは逆転写反応溶液5 μ lの代わりに予め調製したラット腎皮質cDNA 500、250、125、62.5、31.25、15.625ng/ μ l 各5 μ lを用いた。その後、Gene Amp 7900(アプライドバイオシステム社)を用いて50℃ 5分間 1サイクル、95℃ 15秒間及び60℃ 1分間の40サイクルの条件でPCRした。定量はスタンダード直線を作成した後、各サンプルのI型コラーゲン量及びGAPDH量を算出し、次式に従って転写量を算出した。

$$I \text{ 型コラーゲン転写量} = I \text{ 型コラーゲン量} / \text{GAPDH量}$$

得られた結果の統計処理としては、抗Thy-1抗体及びコーンオイル投与群と他の各群

との2群間でそれぞれ分散比のF検定を行い、分散に有意差がない場合にはStudentのt検定(片側)を、分散に有意差がある場合にはAspin-Welch検定(片側)を行った。結果を表3に示す。

本発明化合物(20)が慢性腎不全を改善する能力を有することが確認された。

【0037】

【表3】

群	抗Thy-1抗体	投与物質	コラーゲン遺伝子のmRNA	検定結果
コントロール群	+	コーンオイル	5.6	—
本発明化合物(20)の投与群	+	本発明化合物(20)	2.2	$p < 0.05$
正常群	—	コーンオイル	1.7	$p < 0.01$

【産業上の利用可能性】

【0038】

本発明により、組織におけるI型コラーゲン遺伝子の発現量を減少させ、コラーゲン蓄積量を低下させることにより、組織の線維化を改善させる組成物(即ち、コラーゲン蓄積抑制剤や線維症治療剤)等の開発・提供が可能となる。

【配列表フリーテキスト】

【0039】

配列番号1

PCR用プライマーとしてI型コラーゲン遺伝子の転写調節領域を増幅するために設計されたオリゴヌクレオチド

配列番号2

PCR用プライマーとしてI型コラーゲン遺伝子の転写調節領域を増幅するために設計されたオリゴヌクレオチド

配列番号3

PCR用プライマーとしてI型コラーゲン遺伝子のDNAを検出するために設計されたオリゴヌクレオチド

配列番号4

PCR用プライマーとしてI型コラーゲン遺伝子のDNAを検出するために設計されたオリゴヌクレオチド

配列番号5

プローブとしてI型コラーゲン遺伝子のDNAを検出するために設計されたオリゴヌクレオチド

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Sumitomo Chemical Company Limited

<120> 2H-1-Benzopyrane-2-on compound and use thereof

<130> P156229

<210> 1

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify collagen promoter DNA

<400> 1

ccaagctagc gaaattatct tttctttcat ag 32

<210> 2

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify collagen promoter DNA

<400> 2

ccaaaagctt gcagtcgtgg ccagtacc 28

<210> 3

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to detect collagen DNA

<400> 3

atggtggcag ccagtttga 19

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to detect collagen DNA

<400> 4

caggtacgca atgctgttct tg 22

<210> 5

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide probe to detect collagen DNA

<400> 5

ctcgccttca tgcgcctgct agc 23

【書類名】要約書

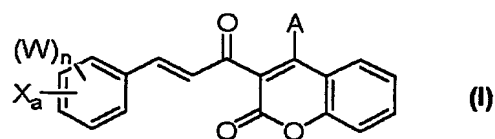
【要約】

【課題】

組織における I 型コラーゲン遺伝子の発現量を減少させ、コラーゲン蓄積量を低下させることにより、組織の線維化を改善させる薬剤の開発・提供が切望されている。

【解決手段】

本発明は、式 (I)



[式中、 X_a はシアノ基で置換された C2-C4 アルケニル基、 $A_1 - R_1 - O -$ 基、 $A_2 - (Y)_m - Z - NH -$ 基又は $A_3 - NHCO -$ 基を表し、 W はハロゲン原子、ニトロ基、C1-C4 アルキル基又は C1-C4 アルコキシ基を表し、 n は 0、1 又は 2 を表し、 n が 2 の場合には W は相異なってよく、 A は水酸基、C1-C4 アルコキシ基、C2-C4 アルケニルオキシ基、C2-C4 アルキニルオキシ基、C1-C4 アルキルアミノ基、C2-C4 アルケニルアミノ基、C2-C4 アルキニルアミノ基、モルホリノ基又はピペリジノ基を表す。]

で示される 2H-1-ベンゾピラン-2-オン化合物等に関する。

【選択図】 なし

【書類名】 手続補正書
【整理番号】 P156229
【提出日】 平成15年10月28日
【あて先】 特許庁長官殿
【事件の表示】
【出願番号】 特願2003-324153
【補正をする者】
【識別番号】 000002093
【氏名又は名称】 住友化学工業株式会社
【代理人】
【識別番号】 100093285
【弁理士】
【氏名又は名称】 久保山 隆
【手続補正1】
【補正対象書類名】 特許願
【補正対象項目名】 発明者
【補正方法】 変更
【補正の内容】
【発明者】
【住所又は居所】 大阪市此花区春日出中三丁目1番98号 住友化学工業株式会社内
【氏名】 東 清史
【発明者】
【住所又は居所】 大阪市此花区春日出中三丁目1番98号 住友化学工業株式会社内
【氏名】 富ヶ原 祥隆
【発明者】
【住所又は居所】 大阪市此花区春日出中三丁目1番98号 住化テクノサービス株式会社内
【氏名】 高橋 淳也
【発明者】
【住所又は居所】 大阪市此花区春日出中三丁目1番98号 住化テクノサービス株式会社内
【氏名】 高橋 千鶴子
【その他】 誤記理由に関しまして、特願2003-324153（出願日：平成15年9月17日）の願書におきまして、本来、その発明者の欄に「東 清史、富ヶ原 祥隆、高橋 淳也、高橋 千鶴子」の4名を記載すべきところ、過誤により「東 清史、富ヶ原 祥隆、高橋 淳也」の3名を記載し、「高橋 千鶴子」の記載を欠落させてしまいました。さらに富ヶ原 祥隆氏の氏名に関して漢字表記を誤り、本来、「富ヶ原 祥隆」と漢字表記すべきところ、「富ヶ原 祥隆」と記載してしまいました。よって、当該両誤記を訂正したく存じます。尚、本手続補正書と同一日付けで提出します手続補正書に真の発明者である者による宣誓書を添付致します。

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2003-324153
受付番号	50301783842
書類名	手続補正書
担当官	田丸 三喜男 9079
作成日	平成 15 年 12 月 8 日

<認定情報・付加情報>

【補正をする者】

【識別番号】

000002093

【住所又は居所】

大阪府大阪市中央区北浜 4 丁目 5 番 33 号

【氏名又は名称】

住友化学工業株式会社

【代理人】

申請人

【識別番号】

100093285

【住所又は居所】

大阪府大阪市中央区北浜 4-5-33 住友化学
知的財産センター株式会社内

【氏名又は名称】

久保山 隆

特願 2 0 0 3 - 3 2 4 1 5 3

ページ : 1/E

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[0 0 0 0 0 2 0 9 3]

1. 変更年月日

1 9 9 0 年 8 月 2 8 日

[変更理由]

新規登録

住 所

大阪府大阪市中央区北浜 4 丁目 5 番 3 3 号

氏 名

住友化学工業株式会社

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.